



**VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS INSTITUTAS
ORGANINĖS CHEMIJOS KATEDRA**

Romuald Stanilko

Farmacinė chemija

Magistro baigiamasis darbas

**POTENCIALIŲ INSULINO AMILODINĖS AGREGACIJOS
SLOPIKLIŲ ĮVERTINIMAS**

Darbo vadovas
dr. Vytautas Smirnovas

(leidimas ginti, data, parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

Vilnius 2020



VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES
INSTITUTE OF CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY DEPARTMENT

Romuald Stanilko

Pharmaceutical chemistry

Master thesis

**SCREENING OF SMALL MOLECULES AS POTENTIAL
INHIBITORS OF INSULIN AMYLOID-LIKE AGGREGATION**

Scientific adviser
dr. Vytautas Smirnovas

(permission to defend, date, signature)

Date of submission _____

Registration No. _____

Vilnius 2020

TURINYS

SANTRUMPOS	3
ĮVADAS.....	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA	5
1.1 Baltymai ir jų taisyklingo sulankstymo svarba	5
1.2 Ląstelės mechanizmai, užtikrinantys tinkamą baltymų sulankstymą	6
1.3 Amiloidinės ligos.....	8
1.4 Insulino agregacijos tyrimai	9
1.5 Amiloidinių fibrilių struktūra	10
1.6 Agregacijos kelias ir kinetika	11
1.7 Tioflavino T fluorescencijos matavimai	12
1.8 Amiloidinės agregacijos slopikliai	13
1.8.1 Polifenoliai	14
1.8.2 Metalų chelatoriai	15
1.8.3 Ftalocianinai	15
1.8.4 Molekuliniai pincetai	16
1.8.5 Nanodalelės	16
1.8.6 Vaistai	16
1.8.7 Vitaminai.....	16
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	17
2.1 Medžiagos, laboratorinė įranga	17
2.1.1 Reagentai.....	17
2.1.2 Laboratorinė įranga.....	17
2.1.3 Mikroplokštelės	17
2.1.4 Buferiniai tirpalai.....	17
2.2 Metodai	17
2.2.1 Mažos molekulinės masės junginių įtakos insulino agregacijai tyrimai.....	17
2.2.2 Tioflavino T fluorescencijos matavimas.....	18
2.2.3 Duomenų apdorojimas	18
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	20
3.1 Slopiklių įtakos insulino amiloidinei agregacijai tyrimai	20
3.2 Slopiklių cheminių struktūrų įvertinimas.....	23
3.3 Planuoti eksperimentai ir galimi rezultatai.....	26
IŠVADOS.....	28

LITERATŪROS SĀRAŠAS.....	29
SANTRAUKA.....	35
SUMMARY	36
1 priedas	37

SANTRUMPOS

AFM – atominės jėgos mikroskopija

AuND – aukso nanodalelės

BMR – branduolių magnetinio rezonanso spektroskopija

EGCG – epigalokatechingalatas

IAPP (ang. *islet amyloid polypeptide*) – salelių amiloido polipeptidas

KR – Kongo raudonasis

PPS – pentosano polisulfatas

ROS – reaktyviosios deguonies rūšys

TEM – transmisinė elektronų mikroskopija

ThT – tioflavinas T

UPS – ubikvitino-proteasomos sistema

IVADAS

Medicinos mokslų pažanga ir sparčiai tobulėjančios technologijos leidžia žmonėms gyventi ilgiau. Remiantis statistika, vien per paskutinius 30 metų, vidutinė žmogaus gyvenimo trukmė pailgėjo 9 metais (Crimmins, 2015). Deja, kartu su gyvenimo trukmės ilgėjimu, didėja ir tikimybė susirgti įvairiomis neurodegeneracinėmis ligomis, tokiomis kaip Alzheimerio, Parkinsono liga, o taip pat II tipo diabetu. Šios ligos yra siejamos su amiloidais – fibrilinais agregatais, sudarytais iš netaisyklingos konformacijos baltymų, kurių randama įvairiuose sergančių žmonių organuose. Baltymai yra pagrindiniai žmogaus organizmo junginiai, nes jie dalyvauja beveik kiekviename organizmo procese. Todėl, jei jų funkcija sutrikusi, pasekmės gali būti pražūtingos.

Baltymų agregacijos procesas siejamas su daugiau nei 50 ligų ir šis skaičius nuolat auga. Nepaisant didžiulių mokslininkų pastangų, šiandien vis dar nėra tinkamų vaistų nuo amiloidinių ligų, yra tik simptominis gydymas (Young, 2015). Per paskutinius keliasdešimt metų buvo ištirtas didelis kiekis skirtingos klasės slopiklių, dalis kurių parodė džiuginančius rezultatus *in vitro* tyrimuose ir pasiekė klinikinių tyrimų stadiją, tačiau ne vienas nebuvo patvirtintas kaip efektyvus vaistinis preparatas. Šiuo metu didžiausias dėmesys skiriamas mažos molekulinės masės junginiams, kurie galėtų slopinti amiloidų susidarymą arba išardyti jau esamus agregatus. Dėl nevienalytės amiloidinių baltymų struktūros ir ne iki galo aiškaus agregacijos mechanizmo, tinkamų vaistų sukūrimas neabejotinai yra sudėtingas uždavinys (Collins, 2014).

Šiuo darbo metu buvo atliekama potencialių amiloidinių baltymų slopiklių atranka, tiriama įvairios struktūros mažos molekulinės masės junginių įtaka agregacijos kinetikai. Tyrimams buvo naudojamas rekombinantinis žmogaus insulinas, kuris sugeba formuoti amiloidines fibriles per santykinai trumpą laiką.

Darbo tikslas – atlikti potencialių insulino amiloidinių fibrilių slopiklių atranką

Darbo uždaviniai:

- Įvertinti 120 įvairios struktūros junginių įtaką insulino agregacijos kinetikai;
- Nustatyti, kokios funkcinės grupės turi didžiausią įtaką agregacijos procesui ir palyginti gautus rezultatus su aprašomais literatūroje;
- Ištirti susidariusių amiloidinių fibrilių struktūros pokyčius.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Baltymai ir jų taisyklingo sulankstymo svarba

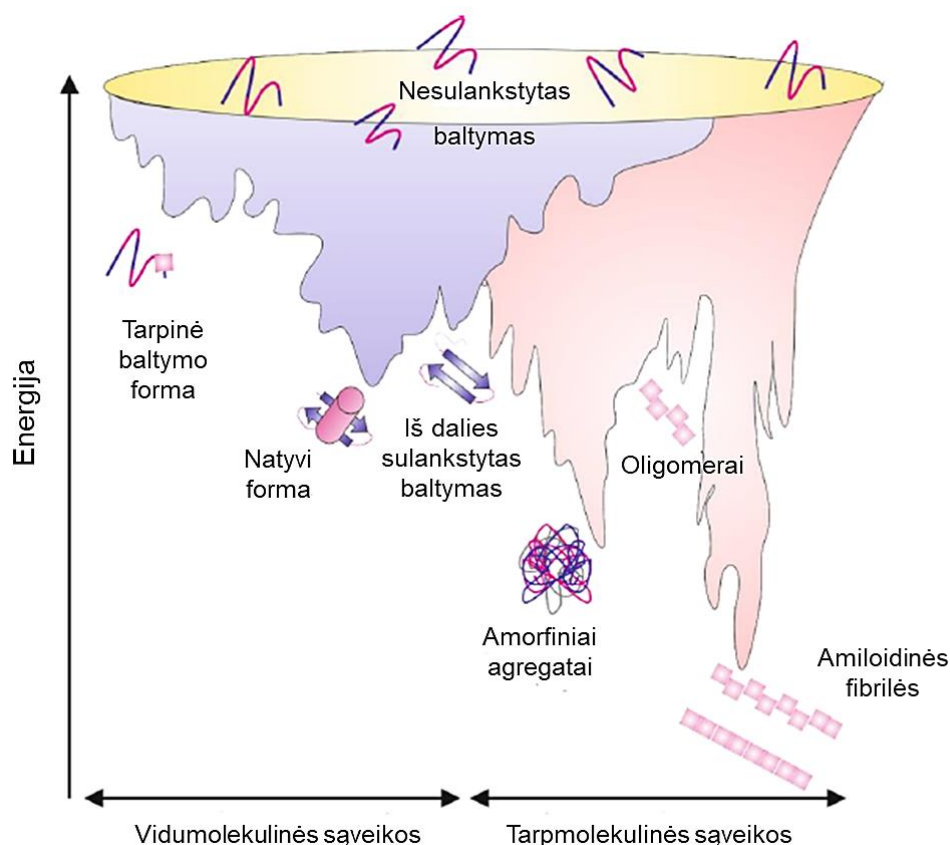
Šiuolaikinis mūsų supratimas apie baltymų funkcionavimą kyla iš beveik 200 metų trukusių biocheminių tyrimų. Naudodamiesi skirtingais eksperimentiniais modeliais, biochemikai pademonstravo, kad baltymai sudaro didžiąją dalį ląstelės struktūrinių komponentų bei dalyvauja daugelyje cheminių reakcijų. Šie eksperimentai atskleidė, kad baltymai yra gyvybiškai svarbūs tinkamai ląstelių funkcijai. Iš tikrųjų, žodis „baltymas“ yra kilęs iš graikų kalbos žodžio „proteios“, reiškiančio „pirmiausia“ arba „svarbiausia“, kas atspindi šių molekulių svarbą (Reynaud, 2010).

Šiandien mokslininkai žino, kad baltymai yra ilgi polimerai, sudaryti iš dvidešimties mažų sudedamųjų dalių, vadinamų aminorūgštimis, rinkinio. Informacija apie baltymų aminorūgščių eiliškumą polimerinėje sekoje yra užkoduota ląstelėse DNR pavidalu. Paprastai po baltymų biosintezės dauguma jų turi būti paverčiami į tvarkingai sulankstytas kompaktiškas struktūras, kad tinkamai atliktų savo biologines funkcijas (Khan ir kt., 2013).

Baltymų sulankstymas yra sudėtingas procesas, kurio metu baltymo molekulė įgyja unikalią trimatę konformaciją. 1969 m. Cyrus Levinthalis pažymėjo, kad dėl labai didelio laisvės laipsnių skaičiaus išskleistoje polipeptido grandinėje, baltymo molekulė turi astronominį galimų konformacijų skaičių. Jei darysime prielaidą, jog 100 aminorūgščių grandinėje kiekviena liekana gali turėti tik dvi galimas konformacijas, tuomet polipeptido grandinėje yra 10^{30} galimų konformacijų. Jei reikia tik 10–11 sekundės, norint konvertuoti vieną konformaciją į kitą, tai prireiktų 10^{11} metų tam, kad atrasti tinkamą baltymui struktūrą, o tai yra nerealus laikas, nes baltymų sulankstymas *in vivo* vyksta sekundėmis ar minutėmis (Salahuddin, 2015; Esteras-Chopo ir kt., 2008). Šis reiškinys žinomas kaip Levinthalio paradoksas. Nobelio premijos laureatas Christianas B. Anfinsen, siekdamas suprasti, kaip baltymai per labai trumpą laiką sugeba įgauti taisyklingą struktūrą, priėjo išvados, jog natyvi baltymo konformacija atsiranda todėl, kad būtent ši forma termodinamiškai yra stabiliausia tarpląstelinėje aplinkoje (**1 pav.**) (Anfinsen, 1973). Kitaip tariant, fizikiniu ir cheminiu baltymo požiūriu, aminorūgštys pakuojasi taip, kad laisva molekulės energija būtų kuo mažesnė.

Skirtingos aminorūgščių šoninės grandinės liekanos suteikia jiems skirtingas savybes. Tinkamai sulankstytame baltyme hidrofobinių aminorūgščių liekanos yra kartu, atsiribodamos nuo vandens molekulių; hidrofilinės liekanos yra veikiamos baltymo paviršiaus, sąveikaujant su citoplazmos vandeniu; o didžiosios aminorūgštys palieka plyšį mažosioms (Young, 2015). Toks sandarus lankstymas ir pakavimas sumažina bendrą laisvą baltymų energiją.

Dažniausiai ląstelėje sudaroma tik natyvi baltymo erdvinė struktūra. Tačiau, esant nepalankioms sąlygoms, baltymai gali palikti sulankstymo kelią vedanti link natyvios būsenos ir patekti į alternatyvius agregacijos kelius, nes energijos skirtumo barjeras tarp natyvios ir klaidingai sulankstyto baltymo yra mažas (Dobson, 2003). Pažymėtina, kad netaisyklingos konformacijos baltymų hidrofobinės aminorūgščių šoninės grandinės išsidėsto baltymo paviršiuje, o ne slepiasi viduje, kaip yra natyvaus baltymo atveju. Tokia hidrofobinių liekanų pozicija suteikia galimybę sąveikauti su kitomis molekulėmis, dėl ko susidaro baltymų agregatai (Khan ir kt., 2013). Baltymų kaupimasis yra savaiminis surinkimo procesas, kurio metu per specifines sąveikas susidaro aukštesnio laipsnio struktūros, pasižyminčios mažu tirpumu. Šios struktūros dažnai vadinamos amiloidinėmis. Agregacijos keliai apima tiek netvarkingų amorfinių agregatų susidarymą, tiek tvarkingų, termostabilių amiloidinių fibrilių formavimąsi. Amorfiniai agregatai nėra toksiški ir juos gali pašalinti proteosomos, tačiau fibrilės bei jų formavimosi kelyje susidariusios oligomerinės rūšys yra laikomos labai toksiškomis ir yra siejamos su daugeliu neišgydomų ligų (Siddiqi ir kt., 2017).



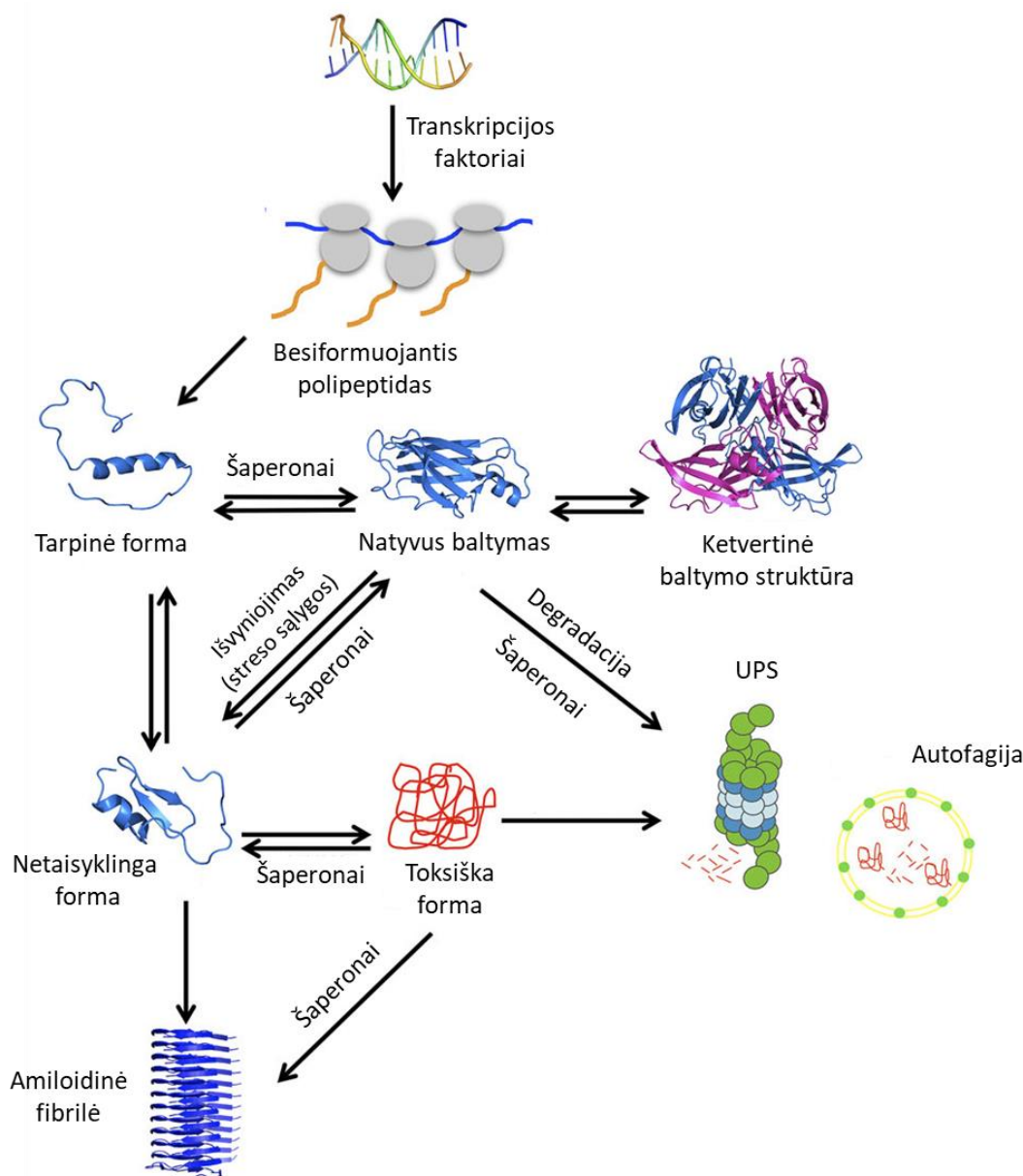
1 pav. Baltymo konformacinių pokyčių energetinė schema. Purpurinis paviršius rodo, kad daugelis tarpinių konformacijų, formuodamos vidinius molekulinis ryšius, veda link natyvios baltymo formos, kuri yra energijos minimume. Rožinis paviršius parodo tas konformacijas, kurios gali sukelti amorfinę agregaciją ar amiloidinių fibrilių susidarymą per tarpmolekulinius kontaktus (Young, 2015).

Pažymėtina, kad toksiška baltymo konfigūracija dažnai gali sąveikauti su kitomis to paties baltymo natyviomis kopijomis ir katalizuoti jų perėjimą į toksišką būseną. Dėl šio sugebėjimo ji yra žinomi kaip užkrečiama konformacija. Infekcinio baltymo arba priono sąvoka buvo pasiūlyta septintajame dešimtmetyje siekiant paaiškinti skrepi infekciją (angl. *scrapie*) – mirtiną degeneracinę avių ir ožkų nervų sistemos ligą (Agbas, 2019). Mokslininkai nustatė, kad užkrečiamasis junginys, perduodantis infekciją, yra atsparus ultravioletiniams spinduliams (kurie paprastai sunaikina nukleorūgštis), ir jie pasiūlė, kad šis junginys sudarytas baltymų pagrindu. Idėja, kad baltymai patys gali būti užkrečiami, buvo labai ginčytina, nes atrodė, kad tai meta iššūkį centrinei molekulinės biologijos dogmai. Galų gale, Stanley B. Prusineris ir jo komanda išgrynino priono baltymus, atsakingus už skrepi ligą, ir jie sugebėjo parodyti, kad baltymai iš tiesų gali būti infekciniai (Prusiner, 1982).

1.2 Ląstelės mechanizmai, užtikrinantys tinkamą baltymų sulankstymą

Siekdamos išspręsti baltymų agregacijos problemą, gyvosios sistemos sukūrė daugybę sudėtingų strategijų, skirtų užtikrinti tinkamą baltymų sulankstymo procesą. Pagrindiniai baltymų pagalbininkai yra kiti specializuoti baltymai, vadinami molekuliniais šaperonais, kurie randami visų tipų ląstelėse (Hartl ir kt., 2011). Pirmą kartą molekulinis šaperonas paminėjo 1978 m. Ronas Laskey, kuris nustatė, kad nukleoplazminas (baltymas, randamas ląstelės branduolyje) gali jungtis su

histonais. Histonai yra branduoliniai baltymai, kurių pagrindinė funkcija yra sąveikauti su DNR ir sudaryti struktūras, žinomas kaip nukleosomos. Laskey pastebėjo, kad nukleoplazminas veikė kaip šaperonas, užtikrindamas histonų veiklą ir užkirsdamas kelią netinkamai sąveikai (Laskey ir kt., 1978). Vienas iš geriausiai ištirtų molekulinų šaperonų yra bakterinis šaperonas „GroEL“, turintis savo struktūroje ertmę, kurioje galima paslėpti nepilnai sulankstytas polipeptidines grandines ir apsaugoti jas nuo išorinių veiksnių poveikio (Hartl ir kt., 2002). Kai kurie molekuliniai šaperonai gali išgelbėti neteisingai sulankstytus baltymus ir suteikia jiems antrą galimybę teisingai susilankstyti, ir yra tokių šaperonų, kurie gali ištirpinti kai kurias agregatų formas (2 pav.). Nors didelis kiekis molekulinų šaperonų yra tik esant stresinėms ląstelei sąlygomis, tačiau akivaizdu, kad net ir mažas jų kiekis vaidina kritinį vaidmenį visuose organizmuose (Dobson, 2003).



2 pav. Ląstelių baltymų reguliacijos, vadinamos proteostazės, schema. Baltymai sintezės metu gali priimti daugybę skirtingų konformacinių būsenų pakeliui į savo natyvią trimatę struktūrą. Proteostazės procesai kontroliuoja baltymų sulankstymą, skatina nefunkcinių baltymų skilimą bei užkerta kelią amiloidinių agregatų kaupimuisi ląstelės viduje (Bargiela ir kt., 2015).

Be molekulinų šaperonų, yra keletas kitų katalizatorių, kurie pagreitina lankstymo proceso veiksmus. Pvz., peptidil-prolilo izomerazės – fermentai, kurie randami tiek prokariotuose, tiek eukariotuose, padidina peptidinių ryšių cis/trans izomerizacijos greitį, apimančių prolino liekanas, bei disulfido izomerazės – peptidai, kurie padidina disulfidinių ryšių susidarymo ir pertvarkymo greitį baltymo viduje (Alam ir kt., 2017).

Eukariotų sistemose daugelis baltymų, sintetinamų ląstelėje, yra skirti sekrecijai į tarpląstelinę aplinką. Tokie baltymai turi atitikti griežtą „kokybės kontrolės“ mechanizmą, kuris apsaugo nuo netinkamų baltymų išsiskyrimo iš ląstelės. Jei vis dėl to ląstelėje esantys pagalbininkai nesugeba užtikrinti tinkamos erdvinės baltymo struktūros susidarymo, tai tokie baltymai yra atpažįstami ir skaidomi ubikvitino-proteosomos sistemos (UPS) būdu. 26S proteosoma yra pagrindinis ląstelių aparatas, atsakingas už tirpių, klaidingai sulankstytų baltymų skaidymą, taip užkertant kelią baltymų agregacijai (Goldberg, 2003). Galiausiai, jei ląstelės mechanizmai per tam tikrą laiko tarpą nesuitvarko su sutrikimais, tai ląstelė siekia apoptozės (Iwata ir kt., 2005). Nenuostabu, kad nesugebėjimas teisingai sulankstyti ar išlaikyti taisyklingą globulinę baltymo struktūrą, priveda prie organizmo sistemų sutrikimų ir ligų.

1.3 Amiloidinės ligos

Nepaisant įvairių organizmo apsauginių mechanizmų prieš baltymų agregaciją, pilnai susitvarkyti su šia problema ne visada pavyksta. Šiandien yra žinoma daugiau nei 50 ligų, susijusių su neįprastu baltymų ir peptidų agregavimu (Alam ir kt., 2017). Amiloidines ligas galima suskirstyti į tris plačias klases (1 lentelė):

- neurodegeneracinės ligos – kai amiloidai nusėda galvos ir nugaros smegenyse;
- neneuropatinė lokalizuota amiloidozė – kai agregacija vyksta viename audinyje (ne smegenyse);
- sisteminė amiloidozė – agregacija vyksta keliuose audiniuose.

1 lentelė. Pagrindinės amiloidinės ligos siejamos su baltymų agregacija (Young, 2015).

Ligos pavadinimas	Susijęs baltymas	Simptomai
Neurodegeneracinės ligos		
Užkrečiama spongiforminė encefalopatija	Priono baltymai	Demencija, ataksija, psichinės problemos
Alzheimerio liga	Amiloidas-β ir Tau	Progresuojanti demencija
Parkinsono liga	α-sinukleinas	Judėjimo sutrikimas
Hantingtono liga	Hantingtono baltymas	Demencija, motorinės ir psichinės problemos
Neneuropatinės lokalizuotos amiloidozės		
II tipo diabetas	Amilinas (IAPP)	Hiperglikemija, insulino trūkumas
Injekcinė amiloidozė	Insulinas	Sumažėjęs insulino pasisavinimas
Apolipoproteino A1 amiloidozė	Apo A-1 fragmentai	Progresuojanti inkstų ir (arba) kepenų liga

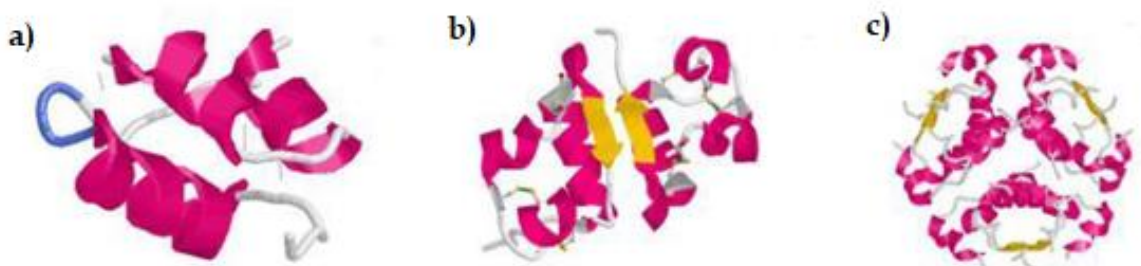
Ligos pavadinimas	Susijęs baltymas	Simptomai
Neneuropatinės sisteminės amiloidozės		
Amiloido lengvosios grandinės (AL) amiloidozė	Imunoglobulino lengvosios grandinės fragmentai	Inkstų nepakankamumas
Su dialize susijusi amiloidozė	β 2-mikroglobulinas	Paraplegija
Lizocimo amiloidozė	Lizocimas	Inkstų nepakankamumas

Labiausiai paplitusi yra Alzheimerio liga, kuria serga apie 10 procentų suaugusiųjų, vyresnių nei šešiasdešimt penki metai (Collins, 2014). Parkinsono liga yra antra labiausiai paplitusi neurodegeneracinė liga, kurios metu nyksta dalis galvos smegenų ląstelių, atsakingų už judesių kontrolę, dėl susidariusių toksiškų α -sinukleino oligomerų (Stefanis, 2012). Tačiau baltymų agregacijos ligos nėra išskirtinai susijusios vien su nervų sistema, jos taip pat gali atsirasti periferiniuose audiniuose. Pvz., II tipo cukrinis diabetas susijęs su amilino, (kitai vadinamo salelių amiloido polipeptido (IAPP)), agregacija kasos Langerhanso salelėse (Westermarck ir kt., 2011). Sergant AL amiloidoze, antikūnų lengvosios grandinės nusėda inkstuose ir širdyje (Santhorawala, 2006), o su dialize susijusioje amiloidozėje, β 2-mikroglobulinas formuoja amiloidines plokšteles osteoartikuliniuose audiniuose (Iadanza ir kt., 2018).

Šios ligos gali būti atsitiktinės (pasireiškiančios be šeimos istorijos) arba šeimyninės (paveldimos). Nepriklausomai nuo rūšies, rizika susirgti bet kuria iš šių ligų dramatiškai padidėja su amžiumi. Mechaninis šios koreliacijos paaiškinimas yra tas, kad senstant (arba dėl mutacijų) trikdoma baltymų sintezės, lankstymo ir skaidymo pusiausvyra (Reynaud, 2010). Pusiausvyros sutrikimą taip pat gali sukelti proteosomos, ląstelių mechanizmo, kuris skaido senstančius baltymus, trūkumai. Autofagijos slopinimas taip pat skatina amiloidų agregaciją (Alam ir kt., 2017).

1.4 Insulino agregacijos tyrimai

Injekcinė amiloidozė, yra reta su oda susijusi insulino terapijos komplikacija. Pacientams, kuriems yra paskirta insulino terapiją, bėgant laikui nuolatiniame insulino sušvirkštimo vietoje gali atsirasti amiloidinės sankaupos. Dėl šios priežasties pablogėja insulino pasisavinimas ir turi būti didinamos vaisto dozės. (Choi ir kt., 2009). Insulino amiloidinių fibrilių tyrimai yra be galo svarbūs, siekiant pagerinti insulino terapiją. Tai yra neatidėliotina problema, nes kenčiančių žmonių skaičius nuo diabeto yra milžiniškas: 2000 m. liga buvo diagnozuota 171 milijonui žmonių pasaulyje ir 2030 m. šis skaičius gali išaugti iki 300 mln. (Iannuzzi ir kt., 2017).

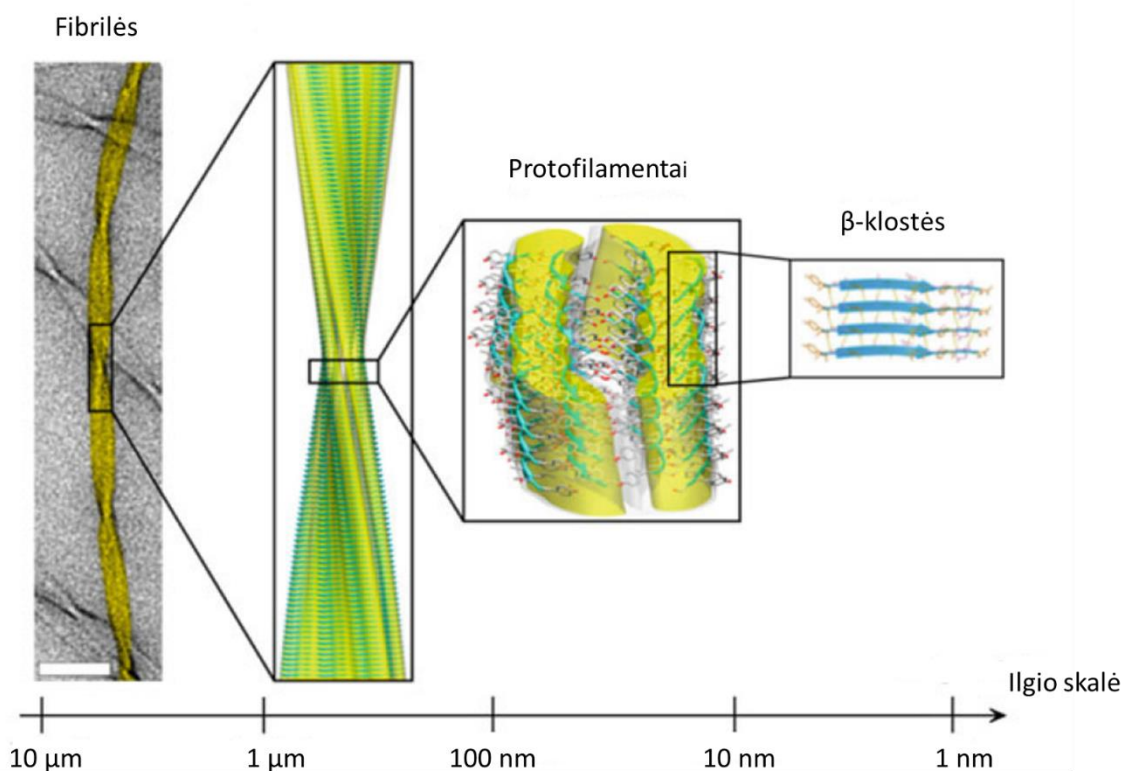


3 pav. Galimos insulino konformacijos : a) monomeras; b) dimeras; c) heksameras (Pandeyarajan ir kt., 2016)

Insulinas nėra tiesiogiai susijęs su visomis žinomomis žmonių amiloidinėmis ligomis, tačiau jis yra puikus modelinis baltymas *in vitro* tyrimams, prieinamas santykinai už žemą kainą bei galintis per trumpą laiką suformuoti amiloidines fibriles. Šis mažas hormono baltymas, susidedantis iš dviejų polipeptidų grandinių, natūraliai organizme gaminamas ir laikomas kaip heksameras (šešių insulino molekulių vienetas), o aktyvioji forma yra monomeras (**3 pav.**). Šešios molekulės yra sujungtos kaip trys dimeriniai vienetai ir sudaro simetrišką molekulę. Esant žemam pH ir aukštai temperatūrai, insulinas lengvai skaidosi į monomeras ir vėliau kaupiasi į amiloidines fibriles ([Choi ir kt., 2009](#)). Be to, žinoma, kad insulinas formuoja polimorfinius amiloidinius agregatus, priklausomai nuo agregacijos sąlygų. Šiuo metu amiloidinių fibrilių polimorfizmas yra gerai atpažįstamas reiškinys, kuris, kaip manoma, susijęs su skirtingais fibrilizacijos keliais, o tai apsunkina tinkamos strategijos sukūrimą prieš baltymų agregaciją ([Sakalauskas ir kt., 2019](#)).

1.5 Amiloidinių fibrilių struktūra

Dauguma baltymų ir peptidų, esant palankioms sąlygoms, gali formuoti amiloidines fibriles ([Fändrich, 2007](#)). Nepriklausomai nuo baltymų kilmės, funkcijos ar aminorūgščių sekos, visi amiloidai atrodo nepaprastai panašūs, turintys fibrilinę morfologiją ir bendrąją ketvirtinę baltymų struktūrą ([Eisenberg ir kt., 2012](#)). Daugybė atliktų tyrimų, įskaitant branduolių magnetinio rezonanso spektroskopiją (BMR), rentgeno spindulių difrakcijos analizę, atominės jėgos mikroskopiją (AFM) ir krioelektroninę mikroskopiją, suteikė suvokimą apie amiloidinių fibrilių atominio lygio architektūrą ([Adam Moser ir Darrin M. York, 2008](#); [Fitzpatrick ir kt., 2013](#)). Pastebėta, kad fibrilės susideda iš tvarkingai išdėstytų baltymų pakartojimų, surinktų hierarchiniu būdu (**4 pav.**).



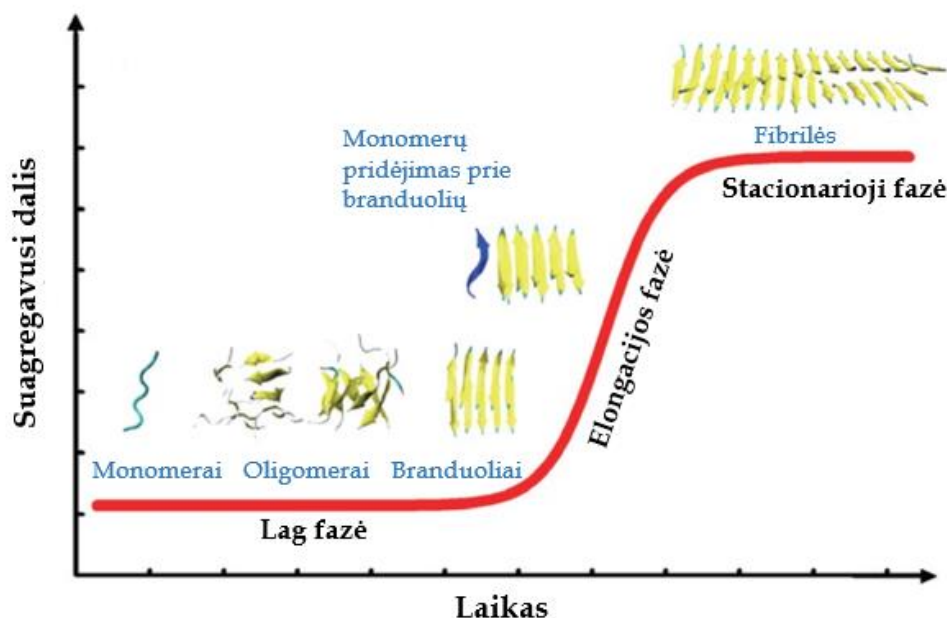
4 pav. Amiloidinių fibrilių hierarchinė struktūra. Kairėje pusėje fibrilių struktūra pavaizduota naudojant transmisinę elektronų mikroskopiją (TEM), skalės juosta = 50 nm ([Perrett et al., 2019](#)).

Didelį amiloidinių fibrilų stabilumą pirmiausia lemia stiprus vandenilinių ryšių tinklas, esantis fibrilės šerdyje. β -klostės (atstumas tarp jų $\sim 10\text{-}12 \text{ \AA}$) yra išrikiuotos statmenai fibrilės ašiai ir eina per visą fibrilės ilgį. Šios struktūros yra pagrindiniai protofilamentų komponentai, kurie vėliau susisukę, suformuoja subrendusias fibriles, kurių plotis yra apie 1-10 nm., o ilgis siekia 10 μm (Perrett ir kt., 2019).

Verta pabrėžti, jog β -klostės struktūra taip pat egzistuoja daugelyje funkcinių natūralių baltymų. Pavyzdžiui, *Escherichia coli* bakterijos iš amiloidinių baltymų sudaro fibrilines tarpląstelines apnašas, kurie palengvina bakterijų sukibimą ir mikrobiomos vystymąsi. Vorų šilkas taip pasižymi β -klostės struktūra, kuri suteikia šilkui plieninį stiprumą bei atsparumą proteazėms ir detergentams. Žmogaus organizme randamas funkcinis amiloidas Pmel17, kuris yra svarbus odos ir akių pigmentacijai (Esteras-Chopo ir kt., 2008).

1.6 Agregacijos kelias ir kinetika

Cheminė kinetika – cheminių reakcijų greičio matavimas ir analizė – smarkiai prisidėjo prie esminio supratimo apie molekulinis mechanizmus, kuriais grindžiamas amiloidų susidarymas (Knowles ir kt., 2014). Fibrilių formavimasis yra sudėtingas daugiapakopis procesas, kurį lemia daugybė įmantriai sujungtų mikroskopinių reakcijų. Šiuo metu kinetiniams tyrimams dažniausiai pritaikomas nukleacinės polimerizacijos modelis, siekiant paaiškinti agregacijos kelią. Fibrilizacijos procesas aprašomas sigmoidine kreive, kuri susideda iš trijų etapų. Pirmoje (lag) fazėje, įvyksta pirminė nukleacija, kuriuos metu peptidiniai monomerai oligomerizuojasi, kad susidarytų didesnės molekulinės masės branduoliai. Kai susiformuoja pakankama branduolių koncentracija, prasideda eksponentinis fibrilių augimas, sparčiai formuojami protofilamentai, kol galiausiai terpėje nebelieka laisvų monomerų (Arosio ir kt., 2015).



5 pav. Agregacijos kelias aprašomas sigmoidine kreive (Xi ir kt., 2016).

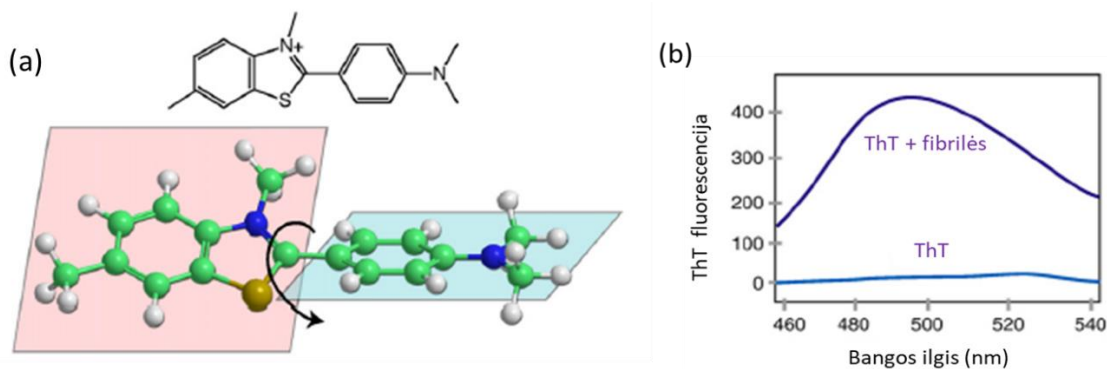
Kai kurios mokslinių tyrimų grupės taip pat pasiūlė papildomus agregacijos procesus, tokius kaip antrinė nukleacija, kai esamų fibrilių paviršius katalizuoja naujų agregatų susidarymą, be to, didesnės fibrilės gali suskilti į mažesnius fragmentus, kurių galai veikia kaip agregacijos centrai. Agregacijos kelio išskaidymas į sudėtinę pakopas yra ypač svarbus norint suprasti molekulinis

procesus, susijusius su patogeninių rūšių atsiradimu, ir nustatyti mechanizmus, kuriais agregacijos slopikliai galėtų veikti (Cohen ir kt., 2013).

1.7 Tioflavino T fluorescencijos matavimai

Baltymų agregacijai nustatyti buvo sukurta įvairių spektroskopinių metodų. Apskritiminio dichroizmo spektroskopija gali būti naudojama antrinės struktūros pokyčiams stebėti, o elektronų paramagnetinis rezonansas (EPR) bei fluorescencinė anizotropija tai metodai leidžiantis nustatyti ankstyvųjų oligomerinių struktūrų susidarymą (Matveeva ir kt., 2012). Šiandien, vienas dažniausiai naudojamų metodų amilodų tyrimams yra fluorescencinių dažų panaudojimas, tokių kaip tioflavinas T (ThT) ir Kongo raudonasis (KR). Pastarasis buvo naudojamas kaip amiloidinis žymeklis nuo 1920-ųjų pradžios, kuris nusidažo būdinga žalių obuolių spalva, kai jungiasi prie amiloidinių struktūrų. Jis visų pirma naudojamas kaip kokybinis tyrimas histologiniam dažymui ir nėra tinkamas realaus laiko tyrimams dėl jo gebėjimo įsiterpti į agregacijos procesą (Groenning, 2010).

ThT yra dažniausiai naudojamas amiloidams specifinis dažiklis *in vitro* agregacijos tyrimams. Jis gali jungtis su struktūromis, turinčiomis daug β -klosčių, todėl stebimas jo fluorescencinio signalo padidėjimas, koreliuojantis su didėjančiu amilodų kiekiu (Xue ir kt., 2017). ThT jungimąsi su agregatais galima stebėti sužadinus dažus 440 nm bangos ilgiu, po kurio galima išmatuoti fluorescencijos emisiją ties 480 nm (Biancalana ir kt., 2010). Nepaisant daugybės eksperimentinių ir skaičiavimo tyrimų, tikslaus atsakymo, kaip ThT rišasi prie amiloidogeninių struktūrų, nėra. Paprastai manoma, kad ThT molekulės išsidėsto grioveliuose tarp tirpiklio paveiktų šoninių grandinių, einančių lygiagrečiai fibrilės ašiai. Tokiu būdu imobilizuojasi ryšis esantis centrineje molekulės dalyje, tarp benzotiazolo ir anilino žiedo, dėl ko padidėja kvantinė išeiga ir stebima fluorescencijos emisija (Westerlund ir kt., 2015).



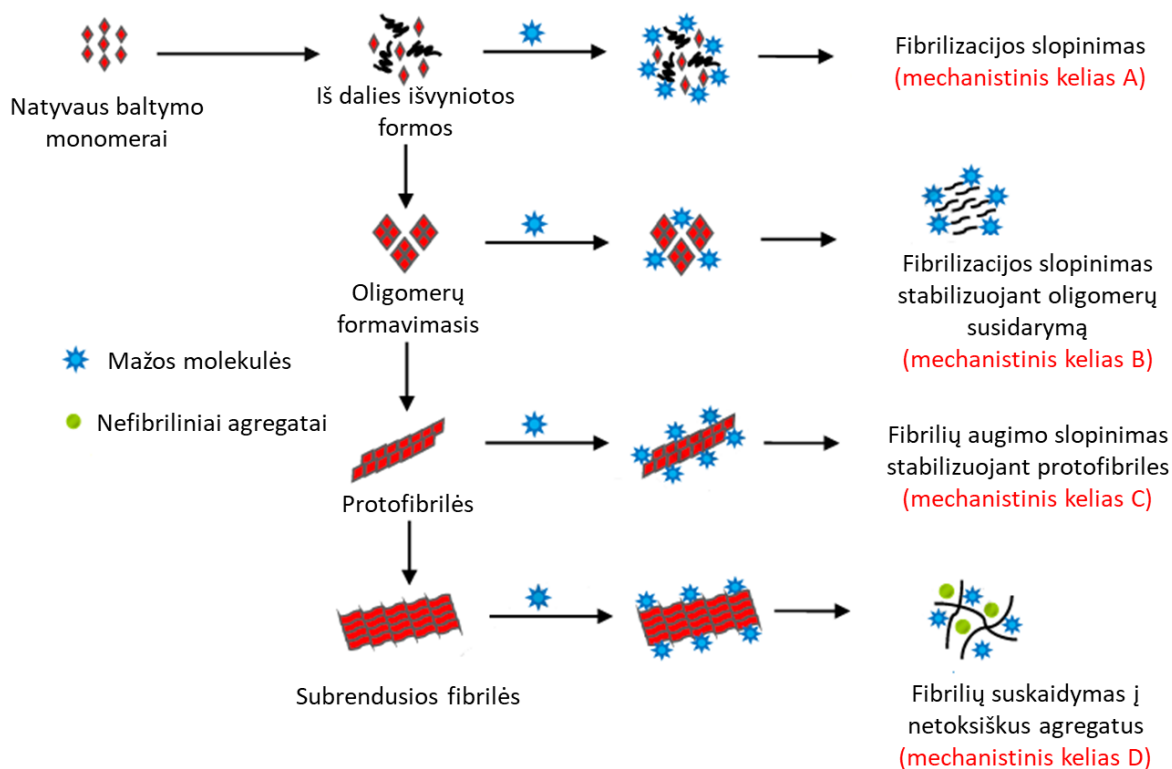
5 pav. (a) ThT molekulės struktūra; (b) ThT florescencijos spektras (Biancalana ir kt., 2010).

Tirpaluose, kuriuose yra vien baltymai, ThT sąveikauja specifiskai vien su amiloidinėmis struktūromis. Nei amorfiniai agregatai, nei oligomerai ar iš dalies sulankstyti baltymai nesustiprina ThT fluorescencijos (Gade Malmos ir kt., 2017). Tačiau ThT gali sąveikauti ir su kitomis biomolekulėmis, tokiomis kaip DNR, jungiantis prie DNR bazių porų arba retesniais atvejais prie DNR griovelių (Biancardi ir kt., 2014). Hialininė kremzlė ir tam tikri baltymai, kaip acetilcholinesterazė, taip pat sukelia būdingą ThT fluorescencija, galimai dėl egzistuojančios tinkamos struktūrinės ertmės (De Ferrari ir kt., 2001). Šios savybės sumažina ThT naudingumą amilodų san kaupų identifikavimui histologiniuose tyrimuose ir paskatino kurti ThT atmainas, tokius kaip „AmytrackerTM“ ir „ProteostatVR“, tačiau šie dariniai yra brangus, todėl atlieka nedidelį vaidmenį amilodų tyrimuose (Gade Malmos ir kt., 2017).

1.8 Amiloidinės agregacijos slopikliai

Atsižvelgiant į daugialypį su amiloidinėmis ligomis susijusių mechanizmų pobūdį, šiuo metu nėra prieinamų gydymo būdų, kurie pakeistu ligos progresavimą, yra tik simptominis gydymas (Sharma ir kt., 2019). Tinkamų vaistų nuo amilodinių ligų sukūrimas yra neabejotinai sudėtingas uždavinys ir buvo laikomasi daugybės strategijų anti-amiloidogeninėms molekulėms sukurti. Iš esmės, amiloidinės agregacijos slopinimas gali būti pasiektas stabilizuojant natyvią baltymo konformaciją arba sumažinant netinkamai sulankstytų struktūrų susidarymo tikimybę (Siddiqi ir kt., 2017). Buvo ištirta daugybė įvairių slopiklių, siekiant įvertinti jų anti-amiloidogeninį poveikį tiek *in vivo*, tiek *in vitro*. Molekulinių šaperonų panaudojimas, kaip pagrindinių kovotojų su netaisyklingu baltymų lankstymu, bei įvairių antikūnų terapija, parodė daug žadančių rezultatų gyvūnų modeliuose, tačiau deja, bandymų rezultatai su žmonėmis nuvylė (Liu ir kt., 2016).

Šiuo metu, didžiausias dėmesys skiriamas mažos molekulinės masės jungianiams, galintiems slopinti baltymų agregaciją. Mažos molekulinės masės slopikliai turi daug pranašumų, lyginant su peptidiniais inhibitoriais – jie gali kirsti kraujo-smegenų barjerą, išvengti imunologinio atsako ir yra stabilesni biologiniuose skysčiuose ir audiniuose (Young, 2015). Tokie „cheminiai šaperonai“ gali veikti stabilizuodami natyvią baltymo struktūrą, užkirsdami kelią klaidingam susilankstymui ir slopinti baltymų savarankišką kaupimąsi ir su tuo susijusį toksiškumą. Kitais atvejais, mažos molekulės gali jungtis prie fibrilių paviršiaus ir slopinti antrinę nukleaciją, kuri yra naujų branduolių ir oligomerų šaltinis (Young ir kt., 2017). Sharma ir kt. pasiūlė kelis galimus slopinimo kelius (6 pav):



6 pav. Įvairūs galimi mechanizmai, per kuriuos mažos molekulės gali slopinti amiloidinių fibrilių susidarymą (Sharma ir kt., 2019).

Kadangi nustatyta, kad oligomerai yra toksiškiausios rūšys, daugiausia dėmesio skiriama šių mažų darinių susidarymui (Young ir kt., 2017). Tai nėra lengva užduotis, nes oligomerinių agregatų

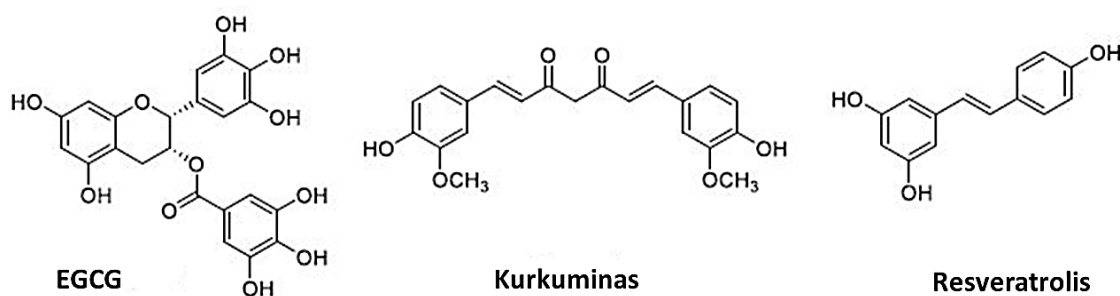
struktūrinį ir funkcinį apibūdinimą ap sunkina jų nevienalytiškumas masės, struktūros, stabilumo ir toksiškumo atžvilgiu. Trumpalaikiai tarpiniai produktai ir oligomerai egzistuoja daugelyje konformacijų, kurios greitai keičiasi viena su kita (Nguyen ir kt., 2014). Nepaisant visų kliūčių, susijusių su tinkamo vaisto sukūrimu, literatūroje randamas didelis skaičius mokslinių tyrimų, kuriuose parodoma įvairių klasių junginių potencialas slopinti ar kitaip įsiterpti į agregacijos procesą. 2 lentelėje pateikiami pavyzdžiai pagrindinių slopiklių, kurių anti-amiloidinės savybės buvo ar yra šiuo metu tiriamos (Alam ir kt., 2017).

2 lentelė. Įvairių klasių baltymų agregacijos slopikliai.

Kategorija	Slopikliai	Baltymai
Polifenoliai	EGCG, kurkuminas, resveratrolis	Amiloidas- β , α -sinukleinas, lizocimas, insulinas
Metalų chelatoriai	Deferioksaminas, pentosano polisulfatas (PPS)	Prionai, α -sinukleinas
Ftalocianinai	Ftalocianino Zn (II) ir Ni (II) dariniai	α -sinukleinas
Molekuliniai pincetai	CLR01	IAPP, transtretinas, β 2-mikroglobulinas, prionai
Nanodalelės	AuND	Amiloidas- β , lizocimas
Vaistai	Pirazinamidas, d-cikloserinas	Amiloidas- β
Vitaminai	Vitaminai A, E, K3	Amiloidas- β , lizocimas

1.8.1 Polifenoliai

Labiausiai paplitusi mažos molekulinės masės slopiklių šeima yra polifenolio junginiai. Polifenoliai yra didelė grupė natūralių ir sintetinių mažų molekulių, kurias sudaro vienas ar keli aromatiniai fenolio žiedai. Literatūroje randama nemažai tyrimų, parodančių, jog polifenoliai gauti iš natūralių produktų, tokių kaip raudonasis vynas, vynuogės, žalioji arbata ir ciberžolė, slopina baltymų agregaciją ir toksiškumą tiek *in vitro*, tiek *in vivo* (Ngoungoure ir kt., 2014).



7 pav. Polifenolių cheminė struktūra (Collins, 2014).

Kurkuminas buvo plačiai ištirtas dėl jo antiagregacinių savybių slopinant daugelį baltymų, įskaitant amiloidą- β , α -sinukleiną, transtretiną, lizocimą ir insuliną (Alam ir kt., 2017). Dėl lipofilinės prigimties jis gali kirsti kraujo smegenų barjerą ir jungtis su amiloidais, dėl ko sumažėja jų citotoksiškumas. Daugelyje tyrimų teigiama, kad kurkuminas yra potencialus Alzheimerio ligos

terapinis vaistas, slopinantis amiloidų susidarymą ir destabilizuojantis fibrilines ar oligomerines formas (Ringman ir kt., 2006). Resveratrolis, polifenolis randamas raudoname vyne, taip pat įrodė savo sugebėjimą mažinti amiloido- β sukeliama toksiškumą. Esant resveratrolui, ląstelių gyvybingumas padidėja dėl jo gebėjimo aktyvinti glutationą – pagrindinį žmogaus organizmo kovotoją prieš reaktyvias deguonies rūšis (ROS) (Kode ir kt., 2008). Taip pat nustatyta, kad šis polifenolis selektyviai pertvarko tirpius amiloido- β oligomerus ir amiloidines fibriles į netoksiškus agregatus (7 pav., pateiktas mechanistinis kelias B ir D) (Ladiwala ir kt., 2010). Be to, resveratrolis gali sulėtinti žmogaus amilino (IAPP) agregaciją, kuri pasireiškia II diabetu sergantiems žmonėms, tačiau pilnai slopinti agregacijos nesugeba (Sharma et al., 2019).

Vienas labiausiai tyrinėjamu polifenoliu yra epigalokatechingalatas (EGCG), kurio dideli kiekiai randami žalioje arbatoje. Įrodyta, jog EGCG gali pertvarkyti jau susiformavusius amiloido- β ir α -sinukleino agregatus ir sumažinti jų toksiškumą ląstelėse. EGCG jungiasi prie β -klosčių struktūrų ir skatina jų skaidymąsi į mažesnius netoksiškus amorfinius agregatus (7 pav., mechanistinis kelias D) (Bieschke et al., 2010). Huntingtono baltymo atveju, EGCG jau pirminėse stadijose slopina fibrilių susidarymą *in vitro* (7 pav., mechanistinis kelias A) (Ehrhoefer ir kt., 2006). Taip pat parodyta, jog EGCG užkerta kelią κ -kazeino agregacijai stabilizuodamas protofibriles, tačiau nesuformuoja amorfinius agregatus (7 pav., mechanistinis kelias C) (Sharma ir kt., 2019). Manoma, kad EGCG aromatiniai žiedai bei daugybė hidroksilo grupių vaidina pagrindinį vaidmenį agregacijos slopinime, kurie jungiasi vandeniliniams ryšiams prie amiloidogeninio baltymo stuburo. Kai šios hidroksilo grupės pašalinamos nuosekliai, molekulės gebėjimas slopinti agregaciją taip pat nuosekliai mažėja (Cao ir kt., 2012).

1.8.2 Metalų chelatoriai

Metalo chelatorių, kaip vaistų nuo amiloidinių ligų, naudojimo principas yra gana paprastas, nes yra įrodyta, kad metalų jonai taip pat vaidina svarbų vaidmenį baltymų patologijose (Gaeta ir kt., 2005). Taigi, jei metalų homeostazė nėra sutrikusi ir organizme nėra metalo jonų pertekliaus, galima išvengti patologinės baltymo formos. Metalų chelatas nėra naujas dalykas, geležies chelatoriai jau seniai naudojami siekiant kontroliuoti geležies perteklių talasemijos atvejais (Alam ir kt., 2017). Pagrindinis metalų chelatorių naudojimo baltymų agregacijos ligoms gydyti tikslas yra persikirstyti ir pakartotinai subalansuoti metalo jonus, užuot juos pašalinus. Deferioksaminas yra gerai apibūdinamas komercinis chelatas, naudojamas Parkinsono ligai gydyti, tačiau jis sunkiai kerta kraujo ir smegenų barjerą. Deferipronas yra vaistas, kuris kerta kraujo smegenų barjerą dėl mažos molekulinės masės ir lipofiliškumo (Ceccom ir kt., 2012). Kliochinolis (5-chlor-7-jodo-8-hidroksichinolinis) yra labiausiai žinomas iš metalų chelatorių, naudojamų neurodegeneracinėms ligoms gydyti. Artimas cheminis kliochinolio giminaitis, PBT2, šiuo metu yra II fazės klinikiniuose tyrimuose (Alam ir kt., 2017). Pentosano polisulfatas (PPS) yra efektyvus polianionas, kurio struktūra panaši į hepariną. Jo veiksmingumas buvo ištirtas su prionais užkrėstais gyvūnais, kuriems preparatas buvo suleistas tiesiogiai į jų smegenų skilvelius. PPS taip pat buvo tiriamas su žmonėmis, sergančiais prionų infekcija, ir rezultatai parodė, kad tai padidino vidutinį paciento išgyvenamumą, tačiau tiesioginė infuzija į smegenis yra gana sudėtinga (Rainov ir kt., 2006).

1.8.3 Ftalocianinai

Ftalocianinai yra junginių klasė, apimanti chlorofilų ir hemų porfirinų šeimą, kuriai būdingas jų aromatinių žiedų sistemos lygumas. Jie laikomi potencialiu terapiniu kandidatu, nes jų mažas

toksiškumas, gerai dokumentuota sintetinė chemija ir sėkmingas skyrimas žmonėms. Ftalocianino tetrasulfonatai (PcTS) yra plačiausiai tiriami tetraپیولiai. Skirtingos PcTS formos veiksmingai slopina prioninių baltymų agregaciją tiek *in vitro*, tiek gyvūnų modeliuose. Ftalocianino Zn (II) ir Ni (II) dariniai veiksmingai slopina amiloidinių fibrilių susidarymą iš α -sinukleino (Lamberto ir kt., 2011). Naujausi tyrimai parodo, kad karboksilinti PcTS [Z (II)] gali slopinti amiloido- β agregaciją *in vitro* bei sumažinti toksiškumą neuronų ląstelių linijoms (Valiente-Gabioud ir kt., 2016).

1.8.4 Molekuliniai pincetai

Molekuliniai pincetai yra junginiai, turintys atviras ertmes, į kurias gali įsiterpti kitos molekulės. Prieš keletą metų atlikti tyrimai parodė, jog molekulinis pincetas CLR01 veiksmingai slopina baltymų agregaciją *in vitro* ir palengvina ligos simptomus Alzheimerio ir Parkinsono gyvūnų modeliuose (Prabhudesai ir kt., 2012). CLR01 taip pat slopina IAPP, kalcitonino, PrP (106–126), insulino, transtiretino ir 2-mikroglobulino amiloidų susidarymą (Sinha ir kt., 2011).

1.8.5 Nanodalelės

Nanodalelės yra pripažintos kaip perspektyvios ir galimos priemonės neurodegeneracijos ir kitų netinkamo baltymų sulankstymo ligų gydymui, nes dėl savo mažo dydžio jos gali kirsti bet kurią žmogaus kūno dalį, įskaitant kraujo ir smegenų barjerą. Paviršiaus charakteristikos ir sudėtis iš esmės lemia nanodalelių įtaką agregacijai. Buvo nustatyta, kad efektyviam amiloido slopinimui reikalingi paviršiniai krūviai ir silpnos hidrofobinės grupės. Pvz. aukso nanodalelės (AuND), kurių paviršiuje yra aromatinių aminorūgščių liekanų, parodo gerus rezultatus tiriant insulino agregaciją (Fuller ir kt., 2019). Kapsaicinu padengtos AuND slopina amiloido susidarymą iš galvijų serumo albumino, kadangi kapsaicinas padaro nanodalelių paviršius hidrofobinius ir jie gali jungtis prie baltymo tarpinių produktų hidrofobinės srities, taip apsaugodami baltymą nuo agregacijos (Yoo ir kt., 2011).

1.8.6 Vaistai

Ibuprofenas buvo plačiai ištirtas ir nustatyta, jog jis mažina Alzheimerio ligos riziką, kadangi gali jungtis prie natyvaus amiloido- β ir padidinti laisvos energijos barjerą, vedančio link agregacijos kelio (Chang ir kt., 2010). Taip pat parodyta, kad vaistai nuo tuberkuliozės d-cikloserinas ir pirazinamidas slopina lizocimo ir amiloido- β baltymų agregaciją. Be to, šie vaistai taip pat sumažina amiloido sukeltą citotoksinį poveikį žmogaus neuronų ląstelių linijai (Chaturvedi ir kt., 2015).

1.8.7 Vitaminai

Vitaminai natūraliai randami žmogaus organizme turi svarbų vaidmenį atliekant fiziologines funkcijas. Keli mokslininkai pademonstravo, jog vitaminai A ir E pasižymi antiamilodinėmis savybėmis, kurios apsaugo nuo amiloido- β sukeltų neuronų ląstelių žūties ir slopina baltymų agregaciją (Ono ir kt., 2007). Neseniai taip pat buvo pranešta apie vitamino K3 slopinantį poveikį lizocimo agregacijai bei apie folio rūgšties gebėjimą efektyviai pristabdyti amilino agregaciją (López ir kt., 2016). Vitaminų slopinimo veiksmingumas gali būti siejamas su jų antioksidaciniu aktyvumu, todėl mokslininkai bando sukurti galimą amiloidinių ligų gydymo metodą, naudodami skirtingų vitaminų derinius.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos, laboratorinė įranga

2.1.1 Reagentai

- Acros Organics: acto rūgštis (99,5 %);
- Carl Roth: natrio chloridas;
- Fisher Scientific: DMSO, NaCl
- Sigma Aldrich: rekombinantinis žmogaus insulinas, tioflavinas T;
- Tiriamieji junginiai, sintetinti Vilniaus Universiteto Biotechnologijos Institute (sąrašas pateiktas 1 priede).

2.1.2 Laboratorinė įranga

- Laboratorinės svarstyklės: „KERN ABJ“, „Kern PLJ 6000- 1GM“;
- Magnetinė maišyklė „Velp Scientifica ARE“;
- Mikroplokštelių skaitytuvas „Synergy H4 Hybrid Multi-Mode“;
- pH metras „Thermo Fisher Orion Dual Star pH/ISE“;
- Purtyklė „IKA KS 4000i control“;
- Spektrofotometrai: „Nanodrop 2000“ , „Shimadzu UV-1800“ ;
- Termostatas „Eppendorf Thermostat plus“;
- Vandens valymo sistema: „Simplicity system“.

2.1.3 Mikroplokštelės

- 96 šulinėlių juoda polistireno mikroplokštelė „Fisherbrand“ (Nr. 215003), skaidrus plokščias dugnas, maksimalus tūris 350 µL;
- Mikroplokštelių sandarinimo juosta „Nunc“.

2.1.4 Buferiniai tirpalai

- Acto rūgšties buferinis tirpalas: 20 % CH₃COOH, 100 mM NaCl, pH≈1,85;

2.2 Metodai

2.2.1 Mažos molekulinės masės junginių įtakos insulino agregacijai tyrimai

Insulinas: Paruošiamas 0,21 mM insulino tirpalas acto rūgšties buferiniame tirpale. Siekiant išvengti didelių svėrimo paklaidų, tiksli insulino tirpalo koncentracija nustatoma „Nanodrop 2000“ arba „Shimadzu UV-1800“ spektrofotometrų pagalba. Baltymo koncentracija matuojama ties 280

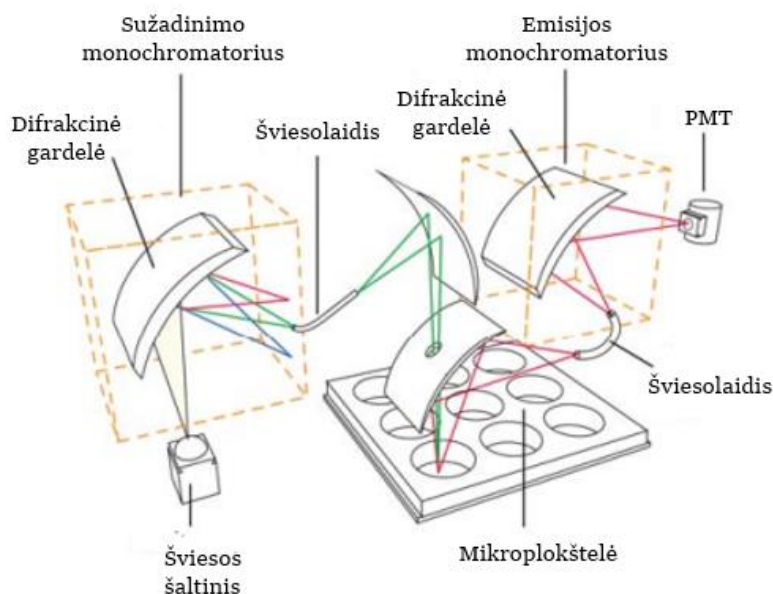
nm bangos ilgio, žinant, jog insulino ekstinkcijos koeficientas lygus $6335 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, o molekulinė masė 5808 Da.

Slopiklių paruošimas: tiriamieji junginiai tirpinami dimetilsulfoksido (DMSO), ruošiant 4 mM koncentratų.

2.2.2 Tioflavino T fluorescencijos matavimas

ThT fluorescencijos metodu buvo stebima 0,2 mM insulino agregacija esant 0,2 mM tiriamojo junginio. Visuose eksperimentuose galutinė ThT koncentracija reakcijos mišinyje buvo $50 \mu\text{M}$, o DMSO kiekis neviršijo 5%. Paruošti mėginai po 200 μL supilami į standartinę mikroplokštelę, kuri vėliau įdedama į mikroplokštelių skaitytuvą „Synergy H4“ bent 12 valandoms, esant pastoviai 60°C temperatūrai. ThT fluorescencija matuojama ramybės sąlygomis (be purtymo).

Tokio tipo prietaisuose pirmoji optinė sistema (sužadavimo monochromatorius) apšviečia mikroplokštelėje esančius mėginius naudojant 440 nm bangos ilgio šviesą (**7 pav**). Sužadintas mėginys pradeda fluorescuoti, o antroji optinė sistema (emisijos monochromatorius) renka išspinduliuotą šviesą atskirdama ją nuo sužadavimo šviesos spindulių (naudojant filtrą arba monochromatorių sistemą) ir matuoja signalą, naudodama šviesos detektorių - fotomultiplito vamzdį (angl. *PMT*). Darbo metu emisija buvo analizuojama iš plokštelės apačios ties 480 nm bangos ilgiu.



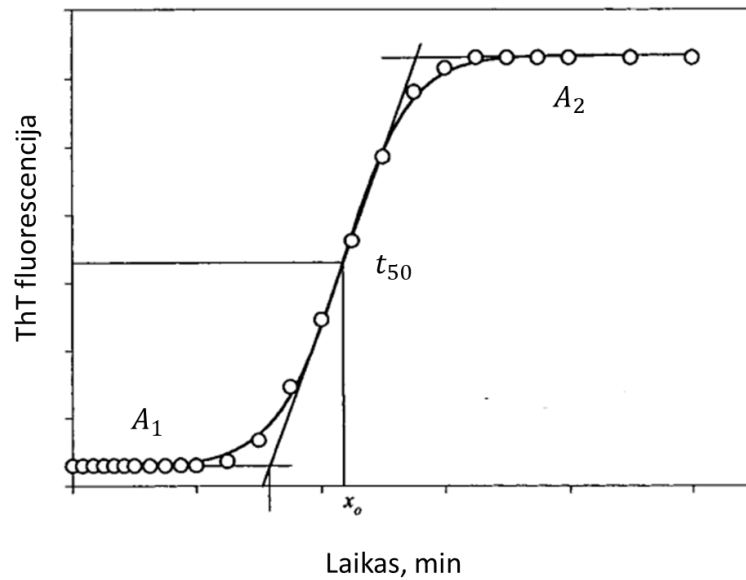
7 pav. Šviesos kelias mikroplokštelių skaitytuvą (Lakowicz, 2006).

2.2.3 Duomenų apdorojimas

Darbo metu gautos ThT fluorescencijos emisijos intensyvumo priklausomybės nuo agregacijos laiko kreivės apdorotos „Microsoft Excel“ ir „Origin 2017“ programomis. Tam, kad duomenys būtų palyginami tarpusavyje, pirmiausia jie yra normalizuojami (1 lygtis).

$$I_{norm} = \frac{I - I_{min}}{I_{max} - I_{min}} \quad (1)$$

Kur, I_{norm} – normalizuotas fluorescencijos intensyvumas, I – išmatuotas fluorescencijos intensyvumas, I_{min} ir I_{max} – minimali ir maksimali fluorescencijos reikšmė.



8 pav. Insulino amilodinių fibrilių formavimosi metu stebimas ThT fluorescencijos intensyvumo pokytis per laiką (Nielsen ir kt., 2001).

Normalizuoti duomenys gluodinami Boltzmann'o sigmoide (**8 pav.**), kuri aprašoma lygtimi 2.

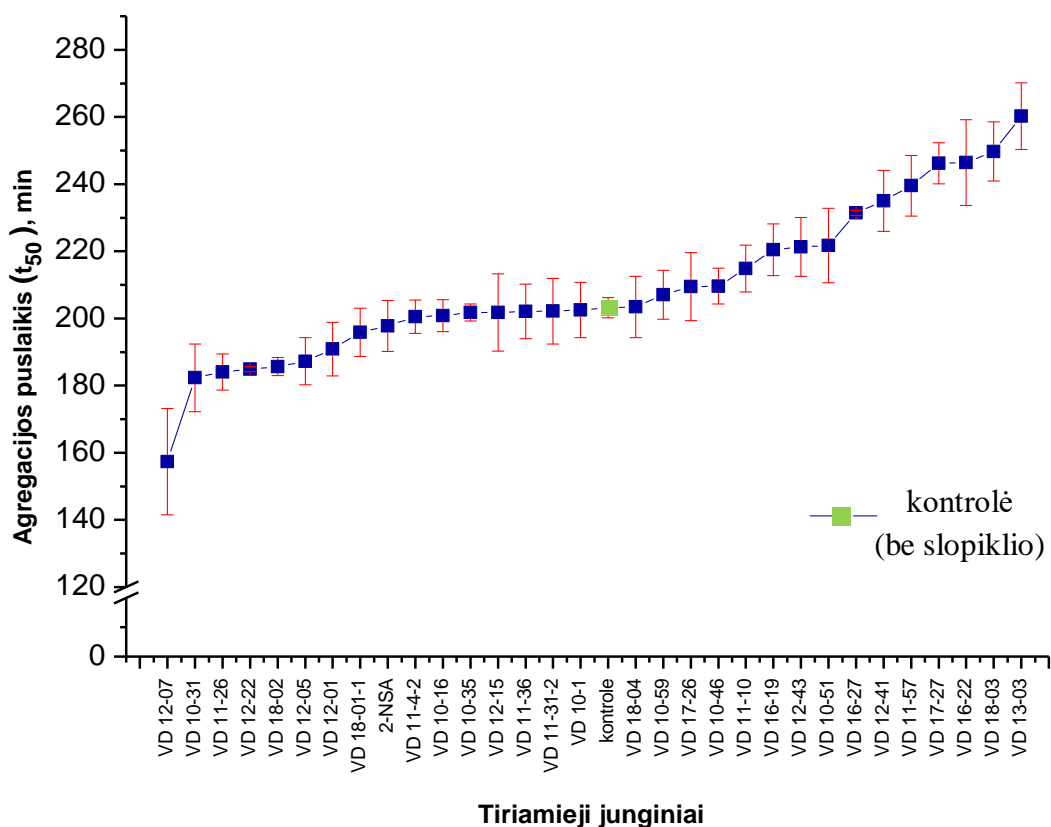
$$y = \frac{A_2 - A_1}{1 + e^{\frac{x_0 - x}{dx}}} + A_1 \quad (2)$$

Lygties y reikšmė – fluorescencijos intensyvumas, A_1 – pradinis fluorescencijos intensyvumas, A_2 – maksimalus fluorescencija intensyvumas, x_0 – laikas, kai fluorescencijos intensyvumas yra 50 % maksimalios vertės (t_{50}), dx – kreivės nuolinkis.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Slopiklių įtakos insulino amiloidinei agregacijai tyrimai

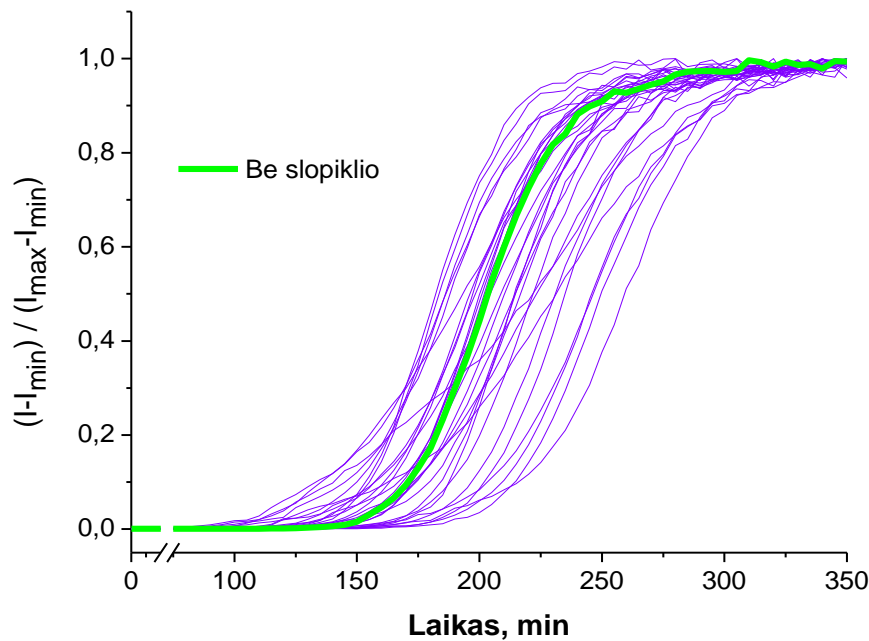
Šio darbo metu iš viso buvo iširta 31 junginio įtaką insulino amiloidinių fibrilių susidarymo kinetikai, kurių tyrimo rezultatai pateikti 9 paveikslėlyje. Grafike pateikti agregacijos puslaikio (t_{50}) pokyčiai lyginant su kontroliniu mėginiu. Didžioji dalis visų junginių (18) – neturėjo didesnės įtakos agregacijos kinetikai, 6 nežymiai pagreitino fibrilių susidarymą, o 7 junginiai parodė nedidelį slopinimo potencialą.



9 pav. Tiriamųjų junginių įtaką insulino amiloidinės agregacijos puslaikiui. Paklaidos apskaičiuotos iš 3 pakartojimų.

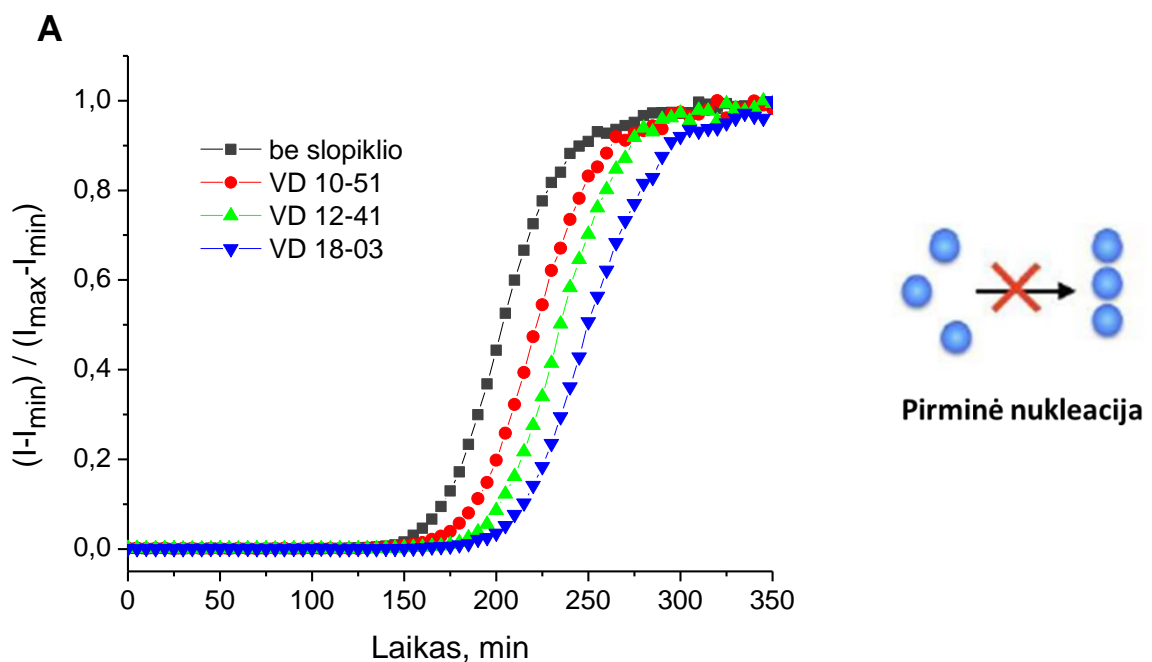
Iš gautų rezultatų nustatyta, jog insulino agregacijos puslaikio reikšmė, kai baltymo koncentracija tirpale yra 0,2 mM ir kai mėginyje nėra jokių analizuojamų slopiklių (kontrolinis mėginyje), siekia vidutiniškai 203 minučių. Pridėjus į mėginius tiriamuosius junginius, geriausių slopinimo rezultatus parodė VD 13-03, VD 18-03, VD 16-22 bei VD 17-27 (cheminė junginių struktūra pateikta 1 priede). Esant šioms slopikliams, insulino amiloidinės agregacijos puslaikis padidėjo apie 45-60 min. (1,21-1,28 karto). Pastėbeta ir tokių junginių, kurie pagreitino fibrilių formavimąsi – esant mėginyje VD 12-07, agregacijos proceso puslaikis sutrumpėjo iki 157 min. (1,29 karto).

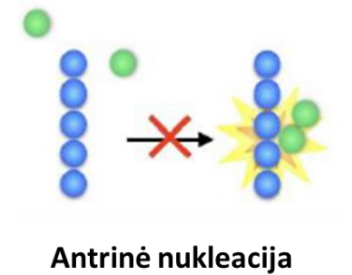
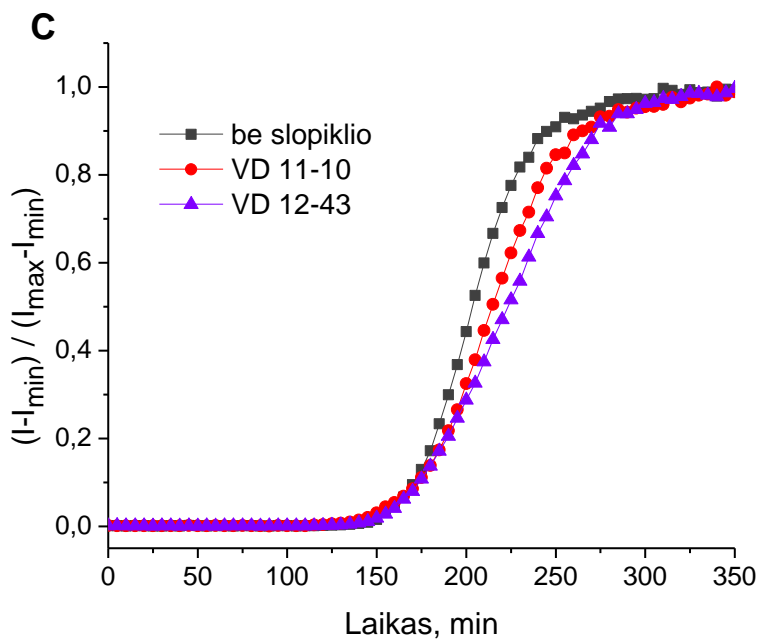
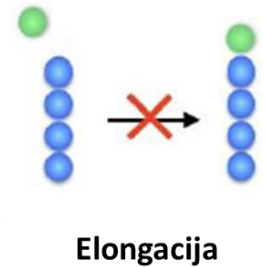
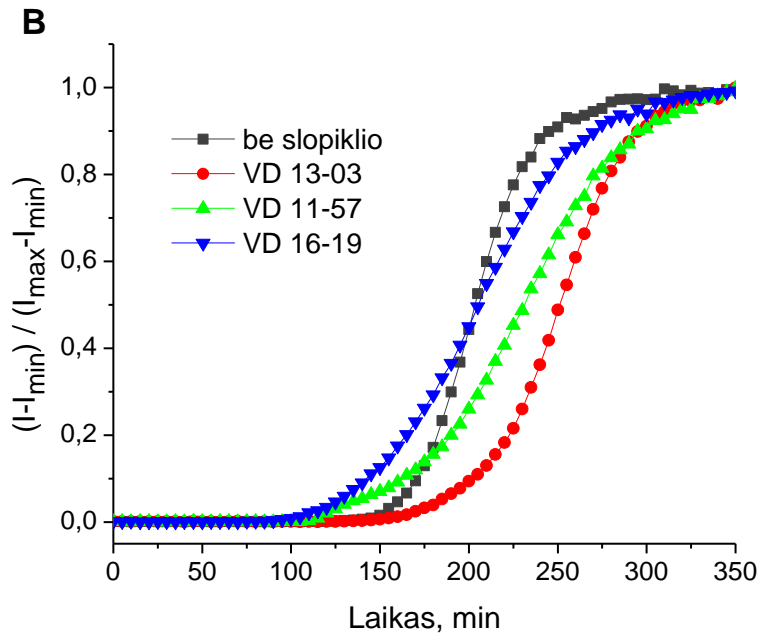
Nors visišku slopinimu nepasižymėjo nei vienas iš tirtų junginių, teigti, jog šie slopikliai neturi jokios reikšmingos įtakos fibrilių formavimuisi, būtų klaidinga. Kaip minėta 1.8 skyrelyje, dėl daugialypio agregacijos mechanizmo pobūdžio, yra keli galimi slopinimo keliai. Norint suprasti, koku būdu slopikliai sąveikauja su baltymu ar jo amiloidinėmis rūšimis, susiformavusiomis agregacijos metu, reikia atlikti detalią kinetinių kreivių analizę. Kaip matoma 10 paveikslėlyje, eksperimentų metu gautos skirtingo pobūdžio sigmoidinės kreivės, lyginant su kontrolinių mėginių.



10 pav. Normalizuotos visų gautų kinetinių kreivių palyginimas.

Būtent pagal tai, kaip pasikeičia bendras kreivės profilis, galima bandyti išsiaiškinti, koks yra slopinimo kelias. Pavyzdžiui, pailgėjęs lag fazės laikas parodo, jog slopikliai stabilizuoja baltymo monomerus, dėl ko pirminių branduolių formavimasis užtrunka ilgiau ir fibrilių augimas prasideda vėliau (**11 pav. A**). Jeigu ilgėjimo fazė tęsiasi žymiai ilgiau negu neesant slopikliui, tai galėtų reikšti apie oligomerinių rūšių stabilizavimą bei protofibrilių susidarymo slopinimą (**11 pav. B**). Kinetinės kreivės, kuriuose pirminė nukleacija įvyksta per tą patį laiką, kaip ir kontrolinis mėginis, tačiau matomas elongacijos fazės poslinkis agregacijos pabaigoje, praneša apie antrinės nukleacijos procesų stabilizavimą (**11 pav. C**). Pagal tokių kreivių profilių apibūdimą, kuris aprašomas daugelyje mokslinių straipsnių ([Arosio ir kt., 2014](#)), buvo sugrupuoti kai kurie šiuo darbu metu gauti rezultatai, pavaizduoti 11 paveikslėlyje.





11 pav. Skirtingi gautų kinetinių krevių profiliai, kurie gali suteikti informaciją apie slopinimo mechanizmą: A) Pirminės nukleacijos slopinimui būdingos kreivės; B) Kreivės, kai slopinimo mechanizmas orientuotas į oligomerų ir protofibrilių stabilizavimą; C) Antrinės nukleacijos procesų stabilizavimas.

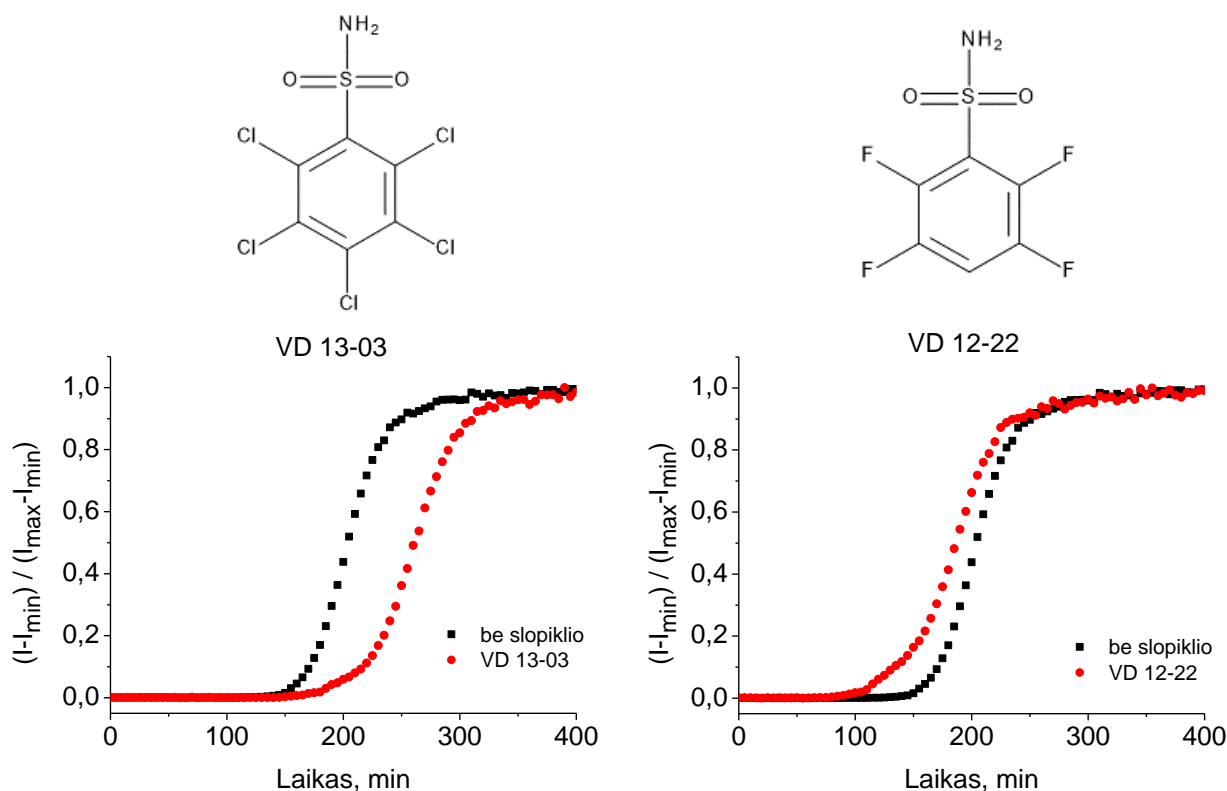
Iš tikrųjų, šie rezultatai negali būti laikomi potencialiu įrodymu apie vykstančius slopinimo procesus, kadangi reikia išsamesnių tyrimų. Tikslesniam įrodymui reiktų atlikti baltymo agregacijos tyrimus su skirtingomis slopiklio koncentracijomis ir palyginti gautus eksperimentinius duomenis su su išanksto kompiuterinių programų pagalba aprašytais agregacijos modeliais. Tokiu būdu galima būtų įsitikinti, ar slopinimas vyksta pagal konkretų dėsningumą, ar vis dėlto tai yra atsitiktinis procesas. Nepaisant to, rezultatai gauti šio darbo metu yra pirmas ženklas, parodantys, jog insulino amiloidinė agregacija gali vykti skirtingais keliais.

3.2 Slopiklių cheminių struktūrų įvertinimas

Biomedicinos mokslų srityje, o ypač vaistų kūrime, viena iš svarbiausių užduočių yra suprasti, kaip mažos molekulinės masės junginiai sąveikauja su baltymais. Paprastai vaistų kūrimas remiasi įvairiais biofizikiniais jungimosi tyrimais ir kompiuteriniais modeliavimais, kurių pagalba stengiamasi susieti cheminio junginio struktūrą su taikinio aktyviuoju centru. Baltymų agregacijos srityje ši užduotis yra begalo sunki, kadangi amiloidiniai baltymai pasižymi nevienalyte struktūra, neturi būdingo aktyviojo centro, prie kurio galėtų jungtis ligandas. Vis dėl to, ištyrus didelį kiekį įvairios struktūros junginių, galima būtų suprasti, kokios funkcinės grupės turi didžiausią įtaką amilodinių baltymų formavimuisi ir kaip keičiasi agregacijos mechanizmas.

Visi mažos molekulinės masės junginiai, kurių įtaka insulino amiloidinei agregacijai buvo tiriama šiame darbe, priklauso aromatinių sulfonamidų klasei. Šios klasės junginiai yra gerai žinomi kaip žmogaus karbonhidrazių slopikliai, kurių termodinaminiai ir kinetiniai parametrai yra gerai ištirti (Linkuvienė ir kt., 2018).

Šiame darbe ištirtų junginių pagrindą sudaro benzesulfonamidas, prie kurio prijungtos įvairios funkcinės grupės. Iš visų junginių, geriausią slopinimo rezultatą parodė junginys VD 13-03, kurio pilnas pavadinimas 2,3,4,5,6-pentachlorobenzensulfonamidas (**12 pav.**). Palyginimui šalia pavaizduoti rezultatai junginio VD 12-22 (2,3,5,6-tetrafluorbenzensulfonamido), kuriame vietoje chloro prie benzeno žiedo yra prijungti fluoro atomai.



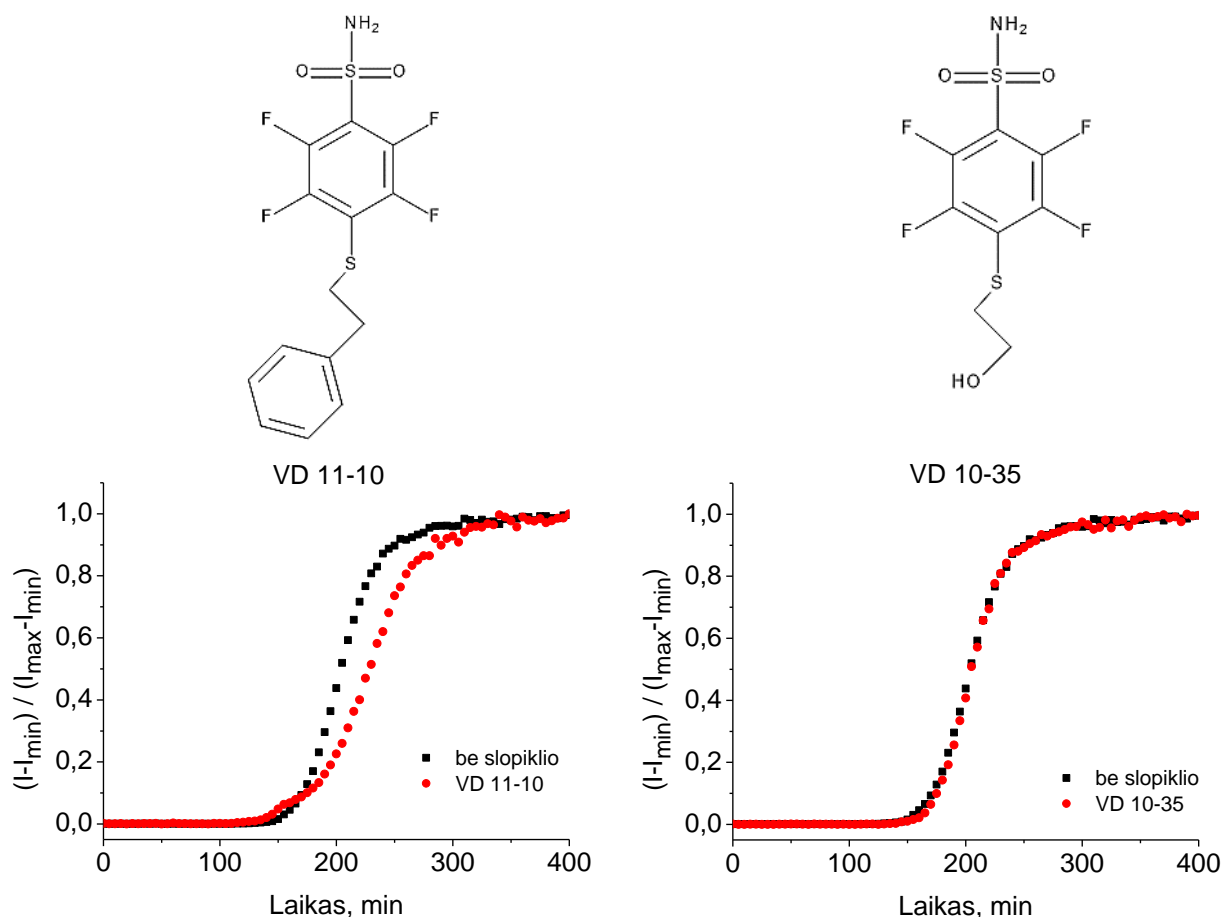
12 pav. Junginių VD 13-03 ir VD 12-22 cheminės struktūros bei jų įtaka insulino agregacijai.

3 lentelė. Agregacijos kreivių kinetiniai parametrai. Paklaidos apskaičiuotos iš 3 pakartojimų.

Kreivė	t_{50} , min	Lag fazė, min
Be slopiklio	203 ± 3	172 ± 5
VD 13-03	260 ± 7	211 ± 10
VD 12-22	185 ± 1	148 ± 4

Iš kinetinių kreivių matome, jog šių junginių įtaka insulino agregacijai yra priešinga – esant mėginyje VD 13-03 agregacijos procesas yra slopinamas, o VD 12-22 atveju pagreitinamas. Toks kontrastas yra ne dėl chloro ir fluoro atomų skirtumo, o dėl junginyje VD 12-22 laisvos *para* padėties benzeno žiede. Fluoro atomų įvedimas į vaistinio junginio struktūrą yra dažnas reiškinys, nes jie vaistui suteikia unikalias farmokologines savybes (Shah ir kt., 2007).

Įvairių funkcinė grupių prijungimas prie laisvos *para* padėties keičia junginio savybes. Štai pvz., prijungus 2-feniletantolio grupę (VD 11-10), stebimas agregacijos slopinimas, o junginys, prie kurio prijungtas 2-hidroksietan-1-tiolis (VD 10-35), neturi jokios įtakos insulino agregacijos kinetikai (13 pav.).



13 pav. Junginių VD 11-10 ir VD 10-35 cheminės struktūros bei jų įtaka insulino agregacijai.

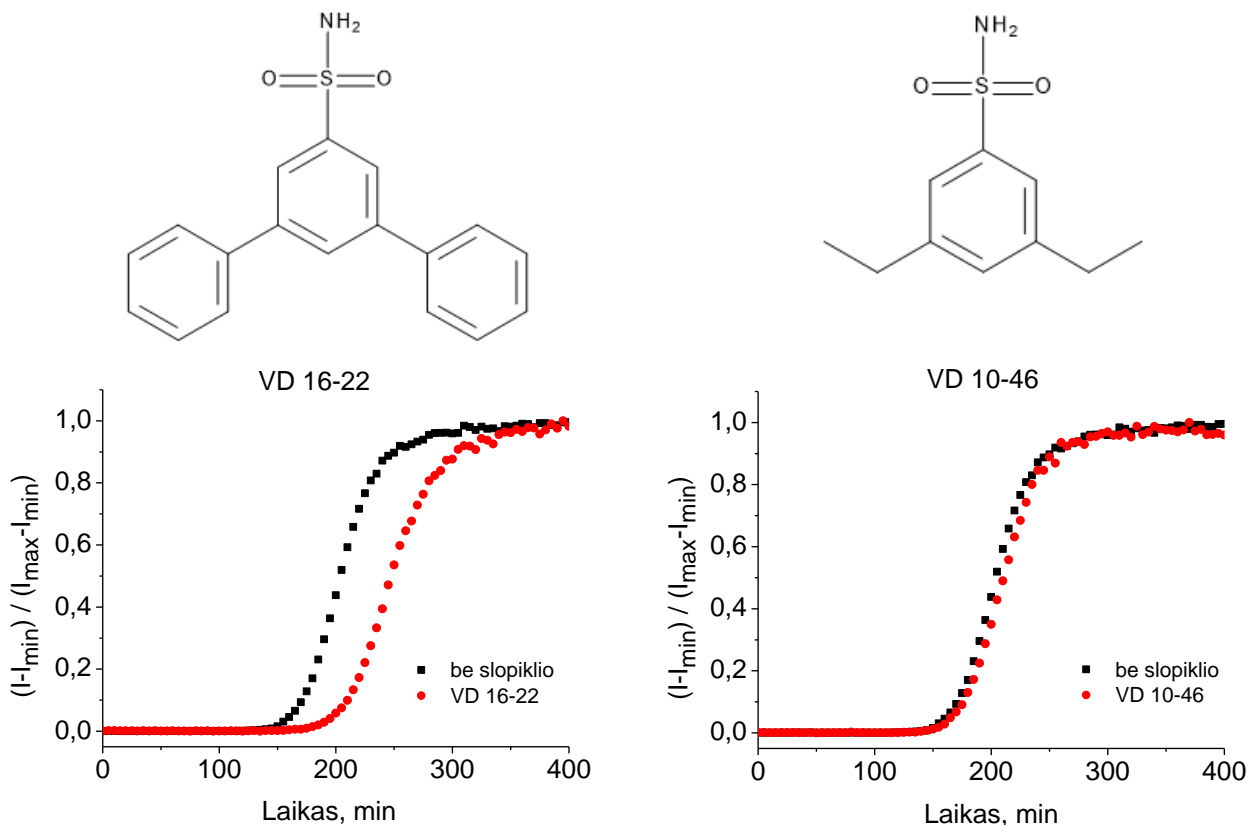
4 lentelė. Agregacijos kreivių parametrai. Paklaidos apskaičiuotos iš 3 pakartojimų.

Kreivė	t_{50} , min	Lag fazė, min
Be slopiklio	203 ± 3	172 ± 5
VD 11-10	227 ± 7	178 ± 8
VD 10-35	202 ± 3	172 ± 3

Vienintelis stuktūrinis skirtumas tarp VD 11-10 ir VD 10-35 yra benzeno ir hidroksi grupės, prijungtos prie tiolio galo. Literatūroje dažnai pabrėžiama, o ypač kai kalbama apie polifenolius, jog būtent hidroksi grupė ir aromatiniai žiedai turi didžiausią įtaką baltymų agregacijai (Velander ir kt., 2017). Hidroksi grupės svarba buvo parodyta ištyrus didelį kiekį įvairios struktūros flavonoidų (didelę klasę augalinių polifenolių). Buvo nustatyta, jog svarbus yra ne tik OH grupių kiekis, bet ir jų pozicija ant aromatinių flavonoidų žiedų. Priklausomai nuo to, kaip išdėstytos šios grupės, agregacijos

procesas gali būti arba slopinamas, arba atvirkščiai – katalizuojamas (Mališauskas ir kt., 2015). Šiame darbe hidroksi grupė napsižymėjo kaip svarbi grupė insulino agregacijos slopinimui.

Aromatinių žiedų veikimo principas aiškinamas tuo, jog jie jungiasi su aromatiniais aminorūgščių šoninėmis grupėmis, tokiu būdu slopinama π - π sąveiką ir neleidžiama baltymams jungtis tarpusavyje ir formuoti agregatus (Collins, 2014). Šio darbo metu, aromatinių žiedų įtaka baltymų agregacijai taip pat buvo pastebėta. Benzensulfonamidas, turintis 3 ir 5 padėtyje fenilo funkcines grupes (VD 16-22), turi slopinimo potencialą, palyginus su junginiu VD 10-46, kuris tose pačiose padėtyse turi prijungtus etilo grupes (14 pav.).

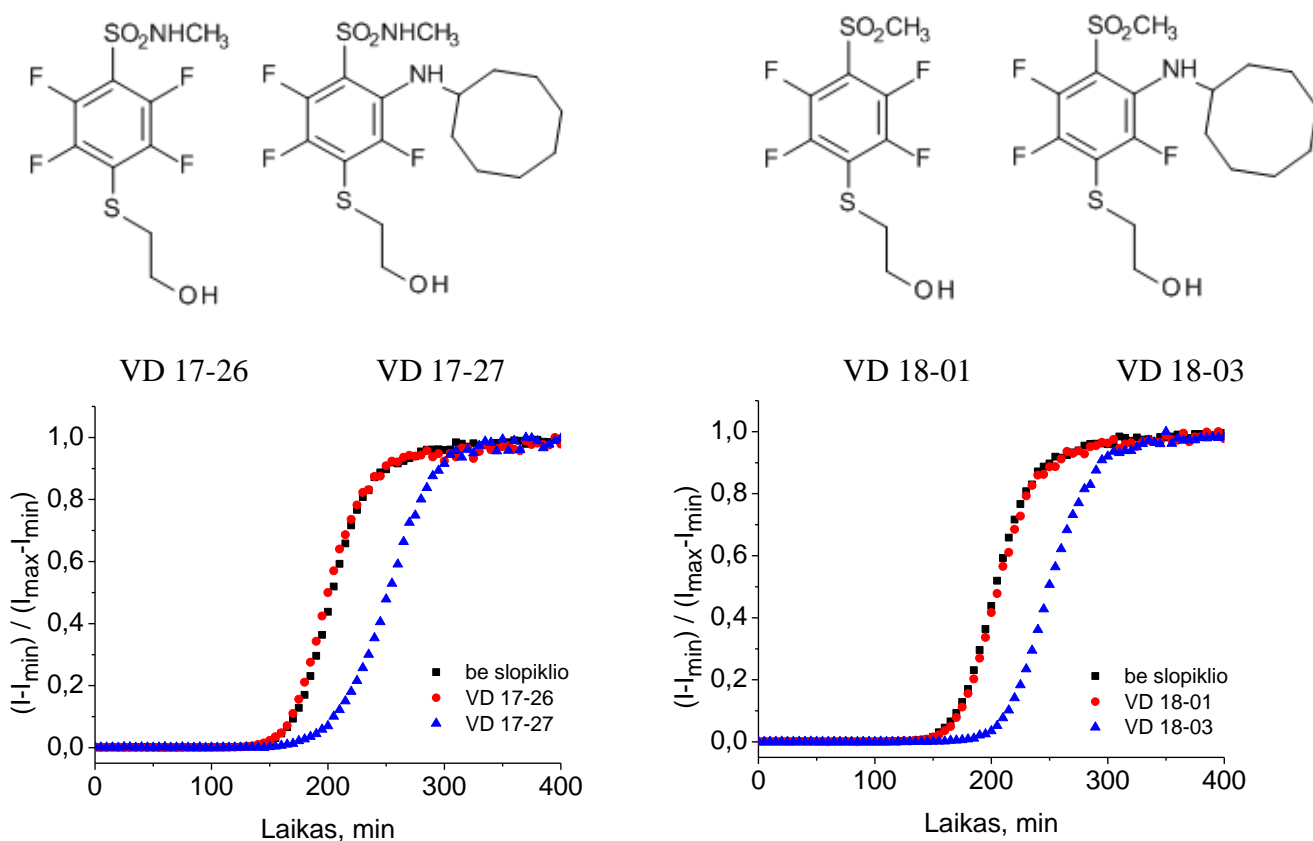


14 pav. Junginių VD 16-22 ir VD 10-46 cheminės struktūros bei jų įtaka insulino agregacijai.

5 lentelė. Agregacijos kreivių parametrai. Paklaidos apskaičiuotos iš 3 pakartojimų.

Kreivė	t_{50} , min	Lag fazė, min
Be slopiklio	203 ± 3	172 ± 5
VD 16-22	246 ± 13	195 ± 14
VD 10-46	210 ± 5	175 ± 6

Sekantis pavazdys parodo, kad galbūt svarbus ne tiek funkcinių grupių aromatiškumas, kiek jų hidrofobiškumas (15 pav.). Yra žinoma, jog hidrofobinė sąveika yra vienas iš svarbiausių veiksnių, skatinančių baltymų agregaciją. Junginiai VD 17-27 ir VD 18-03, kurie *meta* padėtyje turi prijungtą hidrofobinę grupę, galimai jungiasi prie insulino hidrofobinių sričių, tokiu būdu slopinamas baltymo agregacijos procesas. Iš kinetinių kreivių, pavaizduotų 15 paveikslėlyje, matome, jog junginiai neturintys minėtos hidrofobinės grupės, neparodo didesnės įtakos agregacijos kinetikai. Kita vertus, šios grupės mažina bendrą junginio tirpumą, o atsižvelgiant į vaistinėms molekulėms keliamus reikalavimus, tai yra neigiamas efektas.



15 pav. Junginių VD 17-26/VD 17-27 ir VD 18-01/VD 18-03 cheminės struktūros bei jų įtaką insulino agregacijai.

6 lentelė. Agregacijos kreivių parametrai. Paklaidos apskaičiuotos iš 3 pakartojimų.

Kreivė	t_{50} , min	Lag fazė, min
Be slopiklio	203 ± 3	172 ± 5
VD 17-26	199 ± 8	170 ± 3
VD 17-27	251 ± 6	208 ± 6
VD 18-01	197 ± 10	169 ± 12
VD 18-03	250 ± 9	200 ± 13

Skirtingai nei prieš tai analizuojami junginiai, VD 17-26 ir VD 17-27 turi antrinę sulfonamido grupę (-SO₂NHCH₃), o VD 18-01 ir VD 18-03 prie benzeno žiedo turi prijungtą sulfono grupę (-SO₂CH₃). Toks struktūrinis skirtumas parodo, jog galimai sulfonamidinė grupė neturi didesnės įtakos insulino agregacijai.

3.3 Planuoti eksperimentai ir galimi rezultatai

Šio baigiamojo darbo tikslas buvo įvertinti apie 120 skirtingos struktūros mažos molekulinės masės junginių įtaką insulino amiloidinei agregacijai bei ištirti susidariusių fibrilių struktūros pokyčius. Dėl paskelbtos pasaulinės pandemijos, darbas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre įskaitant ir Amiloidų tyrimų grupę, buvo sustabdytas, dėl ko pavyko atlikti tik dalį visų suplanuotų eksperimentų. Junginių charakteristikos, kurių slopinimo efektyvumą insulino agregacijai buvo norima ištirti, yra prieinamos VU Biotechnologijos Instituto darbuotojų publikuotame moksliniame straipsnyje ([Linkuvienė ir kt., 2018](#)).

Eksperimentiniai duomenys, gauti šio darbo metu ištyrus 31 junginio įtaką insulino agregacijos kinetikai, parodo, jog tik maža dalis visų ištirtų junginių pasižymi slopinimo savybėmis, tačiau šių rezultatų nepakanka pilnai įvertinti slopiklio efektyvumą. Mokslinėse publikacijose dažnai aprašoma situacija, kai agregacijos procesas yra tik iš dalies slopinamas, tačiau pabrėžiama, jog tokiais atvejais, vietoj subrendusių fibrilių, gali susiformuoti mažiau toksiškos amiloidinės rūšys (Arosio ir kt., 2014). Norint tai patikrinti, buvo planuojama įvertinti slopiklių įtaką fibrilių morfologijai. Tam dažniausiai naudojama atominės jėgos mikroskopija (AFM) arba transmisinė elektronų mikroskopija (TEM). Šie vaizdavimo metodai leistų įvertinti, ar susidaro būdingos amiloidams fibrilinės struktūros, ar vis dėlto slopikliai geba nukreipti fibrilizacijos kelią į mažiau toksiškų agregatų formavimąsi. Taip pat buvo planuojama atlikti susidariusių agregatų stabilumo tyrimus bei patikrinti jų citotoksiškumą ląstelėms.

Šiuo metu terapinė strategija amiloidinėms ligoms gydyti yra nukreipta į konkrečių toksiškų rūšių slopinimą, o daugiausia dėmesio skiriama tirpiems oligomerams, kurie, kaip manoma, yra pagrindinės ligų vystymosi toksiškos rūšys. Žvelgiant iš šios perspektyvos, labai svarbus yra supratimas apie galimų vaistų molekulinį slopinimo mechanizmą, tačiau tai pasiekti dar yra sudėtinga. Eksperimento požiūriu, mažų molekulių, baltymų monomerų ir fibrilių surišimo apibūdinimas gali būti pasiektas derinant agregacijos kinetikos testus su įvairiais biofizikiniais metodais. Dažniausiai naudojami yra kalorimetriniai, vaizdavimo metodai, taip pat paviršiaus plazmonų rezonansas, Fourier transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija (FTIR), linijinis dichroizmas bei masių spektrometrija. Šie metodai gali suteikti tiesioginę informaciją apie tirpias ar agreguotas rūšis, kurios gali sąveikauti su slopikliu, nustatyti surišimo stechiometriją, ligandų afiniškumą ir selektyvumą, bei išsiaiškinti agregacijos mechanizmus (Arosio ir kt., 2014).

IŠVADOS

1. Šio darbo metu iš viso buvo iširta 31 junginio įtaka insulino amiloidinių fibrilių susidarymo kinetikai – 7 iš jų pasižymėjo silpnomis slopinimo savybėmis.
2. Benzensulfonamido junginiai nepasižymi stipriomis insulino agregacijos slopinimo savybėmis.
3. Dėl paskelbtos COVID-19 pandemijos, amiloidinių fibrilių struktūros pokyčiai nebuvo ištirti, o tikėtini rezultatai yra aprašyti 3.3 poskyryje.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Adam Moser and Darrin M. York, K. R. (2008). Solid State NMR Studies of Amyloid Fibril Structure Robert. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Agbas, A. (2019). Trends of Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases. *Neurochemical Basis of Brain Function and Dysfunction*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81224>
- Alam, P., Siddiqi, K., Chturvedi, S. K., & Khan, R. H. (2017). Protein aggregation: From background to inhibition strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 208–219. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.048>
- Anfinsen. (1973). ' CIE : NCES Folding of Protein Chains. *Science*, 181(4096), 223–230.
- Arosio, P., Knowles, T. P. J., & Linse, S. (2015). On the lag phase in amyloid fibril formation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(12), 7606–7618. <https://doi.org/10.1039/c4cp05563b>
- Arosio, P., Vendruscolo, M., Dobson, C. M., & Knowles, T. P. J. (2014). Chemical kinetics for drug discovery to combat protein aggregation diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(3), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.005>
- Bargiela, R., Herbst, F., Martínez-martínez, M., Seifert, J., Rojo, D., Cappello, S., ... Golyshin, P. N. (2015). www.proteomics-journal.com Page 1 Proteomics, 1–29. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400614>.This
- Biancalana, M., & Koide, S. (2010). Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1804(7), 1405–1412. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001>
- Biancardi, A., Biver, T., Burgalassi, A., Mattonai, M., Secco, F., & Venturini, M. (2014). Mechanistic aspects of thioflavin-T self-aggregation and DNA binding: Evidence for dimer attack on DNA grooves. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(37), 20061–20072. <https://doi.org/10.1039/c4cp02838d>
- Bieschke, J., Russ, J., Friedrich, R. P., Ehrnhoefer, D. E., Wobst, H., Neugebauer, K., & Wanker, E. E. (2010). EGCG remodels mature α -synuclein and amyloid- β fibrils and reduces cellular toxicity. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910723107>
- Cao, P., & Raleigh, D. P. (2012). Analysis of the Inhibition and Remodeling of Islet Amyloid Polypeptide Amyloid Fibers by Flavanols.
- Ceccom, J., Coslédan, F., Halley, H., Francès, B., Lassalle, J. M., & Meunier, B. (2012). Copper chelator induced efficient episodic memory recovery in a non-transgenic Alzheimer's mouse model. *PLoS ONE*, 7(8), 2–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043105>
- Chang, W. E., Takeda, T., Raman, E. P., & Klimov, D. K. (2010). Molecular dynamics simulations of anti-aggregation effect of ibuprofen. *Biophysical Journal*, 98(11), 2662–2670. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.02.031>
- Chaturvedi, S. K., Zaidi, N., Alam, P., Khan, J. M., Qadeer, A., Siddique, I. A., ... Khan, R. H. (2015). Unraveling comparative anti-amyloidogenic behavior of pyrazinamide and D-Cycloserine: A mechanistic biophysical insight. *PLoS ONE*, 10(8), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136528>

- Choi, J. H., May, B. C. H., Wille, H., & Cohen, F. E. (2009). Molecular modeling of the misfolded insulin subunit and amyloid fibril. *Biophysical Journal*, *97*(12), 3187–3195. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.042>
- Cohen, S. I. A., Linse, S., Luheshi, L. M., Hellstrand, E., White, D. A., Rajah, L., ... Knowles, T. P. J. (2013). Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(24), 9758–9763. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218402110>
- Collins, S. (2014). The Identification and Development of Small Molecule Inhibitors for the Aggregation of Amyloid β , 742(May), 2014.
- Crimmins, E. M. (2015). Lifespan and healthspan: Past, present, and promise. *Gerontologist*, *55*(6), 901–911. <https://doi.org/10.1093/geront/gnv130>
- De Ferrari, G. V., Mallender, W. D., Inestrosa, N. C., & Rosenberry, T. L. (2001). Thioflavin T Is a Fluorescent Probe of the Acetylcholinesterase Peripheral Site That Reveals Conformational Interactions between the Peripheral and Acylation Sites. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(26), 23282–23287. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009596200>
- Dobson, C. M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature*, *426*(6968), 884–890. <https://doi.org/10.1038/nature02261>
- Ehrnhoefer, D. E., Duennwald, M., Markovic, P., Wacker, J. L., Engemann, S., Roark, M., ... Wanker, E. E. (2006). Green tea (2) -epigallocatechin-gallate modulates early events in huntingtin misfolding and reduces toxicity in Huntington ' s disease models, *15*(18), 2743–2751. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl210>
- Eisenberg, D., & Jucker, M. (2012). The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell*, *148*(6), 1188–1203. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.022>
- Esteras-Chopo, a, Pastor, M. T., & Serrano, L. (2008). *Protein misfolding and β -amyloid formation. Protein Folding, Misfolding and Aggregation.*
- Fändrich, M. (2007). On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *64*(16), 2066–2078. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7110-2>
- Fitzpatrick, A. W. P., Debelouchina, G. T., Bayro, M. J., Clare, D. K., Caporini, M. A., Bajaj, V. S., ... Dobson, C. M. (2013). Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(14), 5468–5473. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219476110>
- Fuller, M. A., & Köper, I. (2019). Biomedical applications of polyelectrolyte coated spherical gold nanoparticles. *Nano Convergence*, *6*(1). <https://doi.org/10.1186/s40580-019-0183-4>
- Gade Malmos, K., Blancas-Mejia, L. M., Weber, B., Buchner, J., Ramirez-Alvarado, M., Naiki, H., & Otzen, D. (2017). ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation. *Amyloid*, *24*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1080/13506129.2017.1304905>
- Gaeta, A., & Hider, R. C. (2005). The crucial role of metal ions in neurodegeneration : the basis for a promising therapeutic strategy, 1041–1059. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706416>
- Goldberg, A. L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins.

Nature, 426(6968), 895–899. <https://doi.org/10.1038/nature02263>

- Groenning, M. (2010). Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status. *Journal of Chemical Biology*, 3(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s12154-009-0027-5>
- Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324–332. <https://doi.org/10.1038/nature10317>
- Hartl, F. U., & Hayer-Hartl, M. (2002). Protein folding. Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561), 1852–1858. <https://doi.org/10.1126/science.1068408>
- Iadanza, M. G., Jackson, M. P., Hewitt, E. W., Ranson, N. A., & Radford, S. E. (2018). A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(12), 755–773. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0060-8>
- Iannuzzi, C., Borriello, M., Portaccio, M., Irace, G., & Sirangelo, I. (2017). Insights into insulin fibril assembly at physiological and acidic pH and related amyloid intrinsic fluorescence. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12). <https://doi.org/10.3390/ijms18122551>
- Iwata, A., Riley, B. E., Johnston, J. A., & Kopito, R. R. (2005). HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated Huntingtin. *Journal of Biological Chemistry*, 280(48), 40282–40292. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508786200>
- Khan, J. M., Qadeer, A., Ahmad, E., Ashraf, R., Bhushan, B., Chaturvedi, S. K., ... Khan, R. H. (2013). Monomeric Banana Lectin at Acidic pH Overrides Conformational Stability of Its Native Dimeric Form. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062428>
- Knowles, T. P. J., Vendruscolo, M., & Dobson, C. M. (2014). The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(6), 384–396. <https://doi.org/10.1038/nrm3810>
- Kode, A., Rajendrasozhan, S., Caito, S., Yang, S. R., Megson, I. L., & Rahman, I. (2008). Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294(3), 478–489. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00361.2007>
- Ladiwala, A. R. A., Lin, J. C., Bale, S. S., Marcelino-Cruz, A. M., Bhattacharya, M., Dordick, J. S., & Tessier, P. M. (2010). Resveratrol selectively remodels soluble oligomers and fibrils of amyloid A β into off-pathway conformers. *Journal of Biological Chemistry*, 285(31), 24228–24237. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.133108>
- Lakowicz, J. R. (2006). Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy 2.1. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 36. <https://doi.org/10.1002/9783527633500.ch1>
- Lamberto, G. R., Torres-Monserrat, V., Bertocini, C. W., Salvatella, X., Zweckstetter, M., Griesinger, C., & Fernández, C. O. (2011). Toward the discovery of effective polycyclic inhibitors of α -synuclein amyloid assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 286(37), 32036–32044. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.242958>
- Laskey, R. A., Honda, B. M., Mills, A. D., & Finch, J. T. (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*, 275(5679), 416–420.

<https://doi.org/10.1038/275416a0>

- Linkuvienė, V., Zubrienė, A., Manakova, E., Petrauskas, V., Baranauskienė, L., Zakšauskas, A., ... Matulis, D. (2018). Thermodynamic, kinetic, and structural parameterization of human carbonic anhydrase interactions toward enhanced inhibitor design. *Quarterly Reviews of Biophysics*, *51*, e10. <https://doi.org/10.1017/S0033583518000082>
- Liu, J., Yang, B., Ke, J., Li, W., & Suen, W. C. (2016). Antibody-Based Drugs and Approaches Against Amyloid- β Species for Alzheimer's Disease Immunotherapy. *Drugs and Aging*, *33*(10), 685–697. <https://doi.org/10.1007/s40266-016-0406-x>
- López, L. C., Varea, O., Navarro, S., Carrodegua, J. A., De Groot, N. S., Ventura, S., & Sancho, J. (2016). Benzbromarone, quercetin, and folic acid inhibit amylin aggregation. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(6). <https://doi.org/10.3390/ijms17060964>
- Malisauskas, R., Botyriute, A., Cannon, J. G., & Smirnovas, V. (2015). Flavone derivatives as inhibitors of insulin amyloid-like fibril formation. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121231>
- Matveeva, E. G., Rudolph, A., Moll, J. R., & Thompson, R. B. (2012). Structure-selective anisotropy assay for amyloid beta oligomers. *ACS Chemical Neuroscience*, *3*(11), 982–987. <https://doi.org/10.1021/cn3001262>
- Ngoungoure, V. L. N., Schluesener, J., & Paul, F. (2014). Natural polyphenols binding to amyloid : A broad class of compounds to treat different human amyloid diseases, 1–13. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400290>
- Nguyen, P., & Derreumaux, P. (2014). and A β Oligomer / Drug Interactions from Computer Simulations, *47*(2), 603–611.
- Nielsen, L., Khurana, R., Coats, A., Frokjaer, S., Brange, J., Vyas, S., ... Fink, A. L. (2001). Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: Elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry*, *40*(20), 6036–6046. <https://doi.org/10.1021/bi002555c>
- Ono, K., & Yamada, M. (2007). Vitamin A potently destabilizes preformed α -synuclein fibrils in vitro: Implications for Lewy body diseases. *Neurobiology of Disease*, *25*(2), 446–454. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.10.010>
- Pandeyarajan, V., Phillips, N. B., Rege, N., Lawrence, M. C., Whittaker, J., & Weiss, M. A. (2016). Contribution of tyrb26 to the function and stability of insulin structure-activity relationships at a conserved hormone-receptor interface. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(25), 12978–12990. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.708347>
- Perrett, S., Buell, A. K., & Knowles Editors, T. P. J. (2019). *Biological and Bio-inspired Nanomaterials Properties and Assembly Mechanisms. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Retrieved from <http://www.springer.com/series/5584>
- Prabhudesai, S., Sinha, S., Attar, A., Kotagiri, A., Fitzmaurice, A. G., Lakshmanan, R., ... Bronstein, J. M. (2012). A Novel “Molecular Tweezer” Inhibitor of α -Synuclein Neurotoxicity in Vitro and in Vivo. *Neurotherapeutics*, *9*(2), 464–476. <https://doi.org/10.1007/s13311-012-0105-1>
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, *216*(4542), 136–144. <https://doi.org/10.1126/science.6801762>

- Rainov, N. G., Whittle, I. R., & Doh-ura, K. (2006). Treatment Options in Patients with Prion Disease - the Role of Long Term Cerebroventricular Infusion of Pentosan Polysulphate. *Prions*, 41–66. https://doi.org/10.1007/4-431-29402-3_4
- Reynaud, E. (2010). Protein misfolding and degenerative diseases. *Nature Education*, 3(9), 28. <https://doi.org/10.1038/nature02261>.
- Ringman, J. M., Frautschy, S. A., Cole, G. M., Masterman, D. L., & Cummings, J. L. (2006). NIH Public Access, 2(2), 131–136.
- Sakalauskas, A., Ziaunys, M., & Smirnovas, V. (2019). Concentration-dependent polymorphism of insulin amyloid fibrils. *PeerJ*, 2019(12). <https://doi.org/10.7717/peerj.8208>
- Salahuddin, P. (2015). Protein Folding, Misfolding, Aggregation And Amyloid Formation: Mechanisms of A β Oligomer Mediated Toxicities. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology Research*, 1(2), 36–45. <https://doi.org/10.17554/j.issn.2313-7177.2015.01.4>
- Sanchorawala, V. (2006). Light-chain (AL) amyloidosis: diagnosis and treatment. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 1(6), 1331–1341. <https://doi.org/10.2215/CJN.02740806>
- Shah, P., & Westwell, A. D. (2007). The role of fluorine in medicinal chemistry. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 22(5), 527–540. <https://doi.org/10.1080/14756360701425014>
- Sharma, V., & Ghosh, K. S. (2019). Inhibition of Amyloid Fibrillation by Small Molecules and Nanomaterials: Strategic Development of Pharmaceuticals Against Amyloidosis. *Protein & Peptide Letters*, 26(5), 315–323. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190307164944>
- Siddiqi, M. K., Alam, P., Chaturvedi, S. K., Shahein, Y. E., & Khan, R. H. (2017). Mechanisms of protein aggregation and inhibition. *Frontiers in Bioscience - Elite*, 9(1), 1–20. <https://doi.org/10.2741/e781>
- Sinha, S., Lopes, D. H. J., Du, Z., Pang, E. S., Shanmugam, A., Lomakin, A., ... Bitan, G. (2011). Lysine-specific molecular tweezers are broad-spectrum inhibitors of assembly and toxicity of amyloid proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 133(42), 16958–16969. <https://doi.org/10.1021/ja206279b>
- Stefanis, L. (2012). α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2), 1–23. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>
- Valiente-Gabioud, A. A., Miotto, M. C., Chesta, M. E., Lombardo, V., Binolfi, A., & Fernández, C. O. (2016). Phthalocyanines as Molecular Scaffolds to Block Disease-Associated Protein Aggregation. *Accounts of Chemical Research*, 49(5), 801–808. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00507>
- Velander, P., Wu, L., Henderson, F., Zhang, S., Bevan, D. R., Xu, B., & Author, B. P. (2017). Natural product-based amyloid inhibitors HHS Public Access Author manuscript. *Biochem Pharmacol*, 139, 40–55. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.04.004>
- Westerlund, F., Lindberg, D. J., & Wrane, M. S. (2015). Biochemical and Biophysical Research Communications on morphological differences in amyloid fibrils formed by A β (1-40) and A β (1-42), 458, 418–423. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.132>

- Westermarck, P., Andersson, A., & Westermarck, G. T. (2011). Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiological Reviews*, *91*(3), 795–826. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2009>
- Xi, W.-H., & Wei, G.-H. (2016). Amyloid- β peptide aggregation and the influence of carbon nanoparticles. *Chinese Physics B*, *25*(1), 018704. <https://doi.org/10.1088/1674-1056/25/1/018704>
- Xue, C., Lin, T. Y., Chang, D., & Guo, Z. (2017). Thioflavin T as an amyloid dye: Fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *Royal Society Open Science*, *4*(1). <https://doi.org/10.1098/rsos.160696>
- Yoo, S. Il, Yang, M., Brender, J. R., Subramanian, V., Sun, K., Joo, N. E., ... Kotov, N. A. (2011). Inhibition of amyloid peptide fibrillation by inorganic nanoparticles: Functional similarities with proteins. *Angewandte Chemie - International Edition*, *50*(22), 5110–5115. <https://doi.org/10.1002/anie.201007824>
- Young, L. (2015). Defining the mechanism of small molecule inhibition of amyloid fibril formation using ion mobility spectrometry – mass spectrometry.
- Young, L. M., Ashcroft, A. E., & Radford, S. E. (2017). Small molecule probes of protein aggregation. *Current Opinion in Chemical Biology*, *39*, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.06.008>

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

ROMUALD STANILKO

Potencialių insulino amiloidinės agregacijos slopiklių įvertinimas

Baltymų agregacija siejama su daugeliu neurodegeneracinių ligų, tokių kaip Alzheimerio, Parkinsono, o taip pat II tipo diabetu. Nepaisant didžiulių mokslininkų pastangų, šiandien vis dar nėra tinkamų vaistų nuo amiloidinių ligų. Per paskutinius keliasdešimt metų buvo ištirtas didelis kiekis skirtingos klasės slopiklių, tačiau nė vienas nepaėjo sėkmingai klinikines stadijas. Šiuo metu didžiausias dėmesys skiriamas mažos molekulinės masės junginiams, kurie galėtų stabilizuoti natyvią baltymo struktūrą ir apsaugoti nuo agregacijos procesų.

Šio darbo metu buvo tiriama įvairios struktūros junginių įtaką insulino amiloidinei agregacijai. Baltymo agregacija buvo stebima fluorescencinės spektroskopijos metodu, naudojant dažą tioflaviną T (ThT). Iš viso buvo ištirtas 31 junginys, iš kurių 7 pasižymėjo silpnomis slopinimo savybėmis. Remiantis gautais rezultatais pastebėta, jog yra keli galimi slopinimo keliai.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

ROMUALD STANILKO

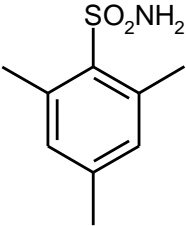
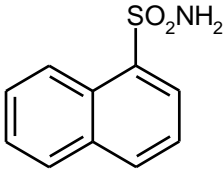
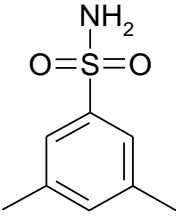
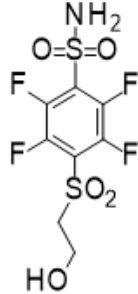
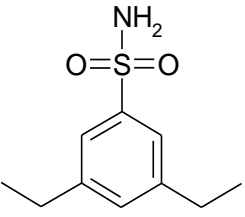
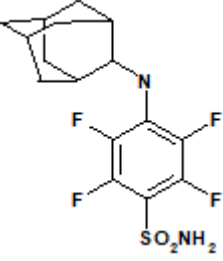
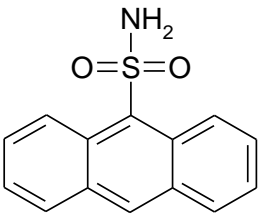
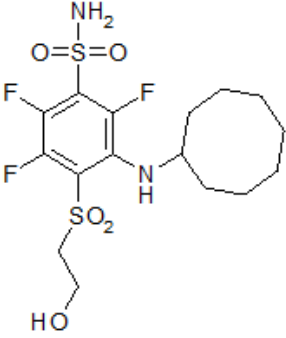
Screening of small molecules as potential inhibitors of insulin amyloid-like aggregation

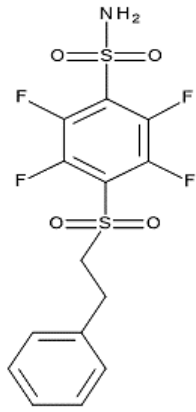
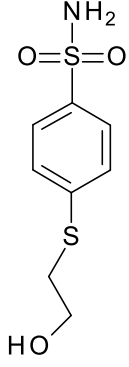
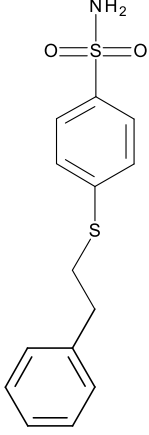
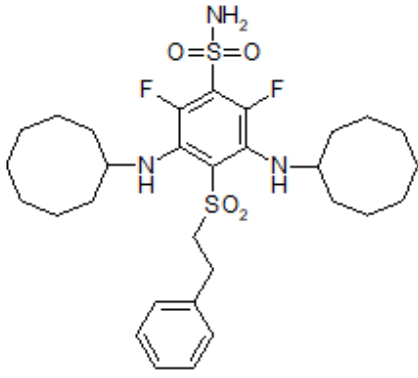
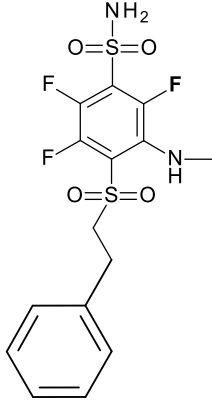
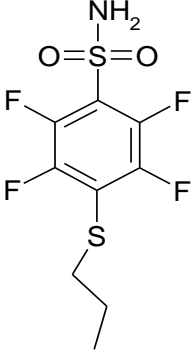
Protein aggregation is associated with many neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, also with II type diabetes. Despite the best efforts of scientists, there is still no effective treatment for amyloid diseases. Over the past few decades, large quantities of various class inhibitors have been investigated, but none of them has successfully passed the clinical trials. Currently, one of the more promising approaches allows the inhibition of amyloid formation by small-molecule inhibitors. This approach is supported by the propensity of small molecules to specifically interact with amyloid assemblies at the molecular level and, thus, inhibit the self-assembly process.

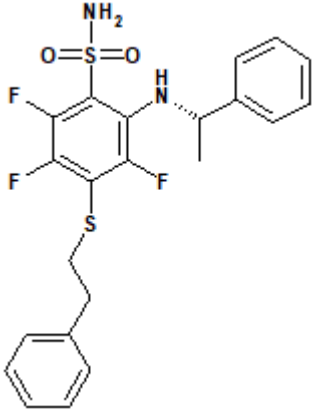
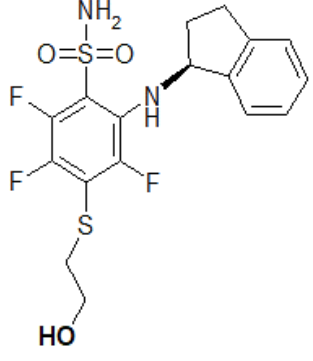
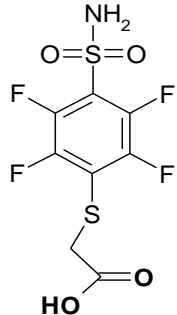
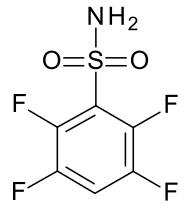
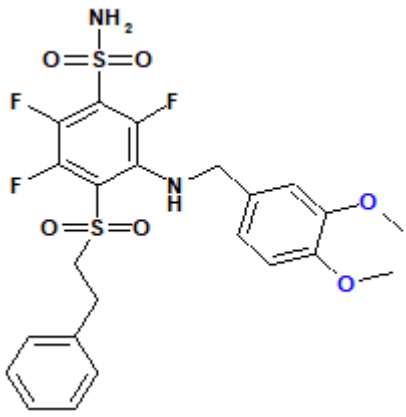
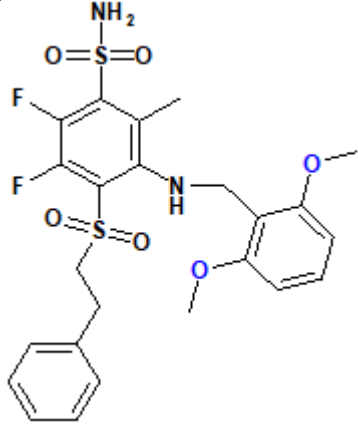
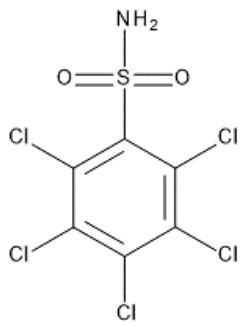
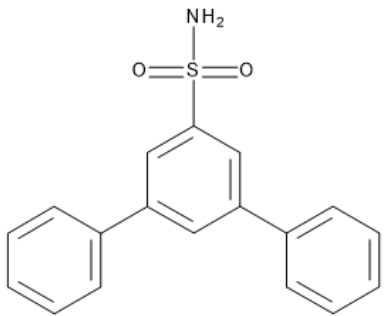
In this work, the impact of different compounds on recombinant insulin aggregation was investigated. Protein aggregation was monitored by fluorescence spectroscopy using thioflavin T (ThT) dye. A total of 31 compounds were examined, 7 of them showed weak inhibitory properties. Also it was noticed, that several inhibition paths are possible.

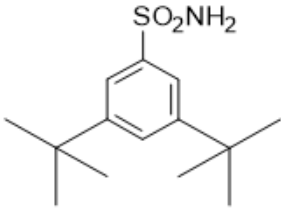
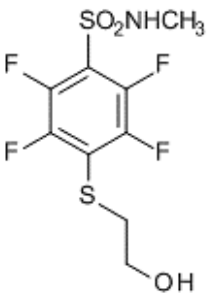
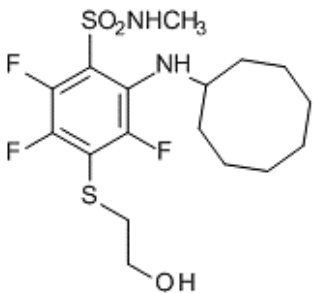
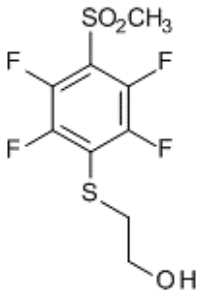
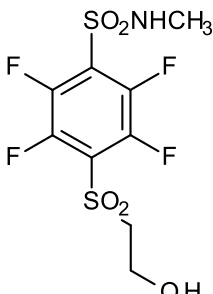
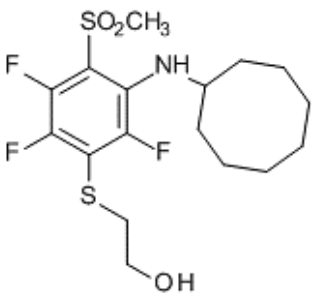
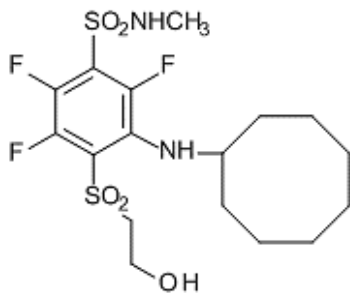
IŠTIRTŲ MOLEKULIŲ SĄRAŠAS

7 lentelė. Šio darbo metu ištirtų junginių sąrašas.

<p style="text-align: center;">VD 10-1</p> 	<p style="text-align: center;">VD 10-6</p> 
<p style="text-align: center;">VD 10-31</p> 	<p style="text-align: center;">VD 10-35</p> 
<p style="text-align: center;">VD 10-46</p> 	<p style="text-align: center;">VD 10-51</p> 
<p style="text-align: center;">VD 10-59</p> 	<p style="text-align: center;">VD 11-4-2</p> 

<p style="text-align: center;">VD 11-10</p> 	<p style="text-align: center;">VD 11-31-2</p> 
<p style="text-align: center;">VD 11-36</p> 	<p style="text-align: center;">VD 11-57</p> 
<p style="text-align: center;">VD 11-26</p> 	<p style="text-align: center;">VD 12-05</p> 

<p style="text-align: center;">VD 12-07</p> 	<p style="text-align: center;">VD 12-15</p> 
<p style="text-align: center;">VD 12-01</p> 	<p style="text-align: center;">VD 12-22</p> 
<p style="text-align: center;">VD 12-43</p> 	<p style="text-align: center;">VD 12-41</p> 
<p style="text-align: center;">VD 13-03</p> 	<p style="text-align: center;">VD 16-22</p> 

<p style="text-align: center;">VD 16-27</p>	<p style="text-align: center;">VD 16-19</p> 
<p style="text-align: center;">VD 17-26</p> 	<p style="text-align: center;">VD 17-27</p> 
<p style="text-align: center;">VD 18-01-1</p> 	<p style="text-align: center;">VD 18-02</p> 
<p style="text-align: center;">VD 18-03</p> 	<p style="text-align: center;">VD18-04</p> 
<p style="text-align: center;">2- NSA</p> 